МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

РЕСПУБЛИКАНСКОЕ УНИТАРНОЕ ПРЕДПРИЯТИЕ «ЦЕНТР ЭКСПЕРТИЗ И ИСПЫТАНИЙ В ЗДРАВООХРАНЕНИИ»

ГОСУДАРСТВЕННАЯ ФАРМАКОПЕЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

ПЕРВОЕ ИЗДАНИЕ

Введено в действие с   2006 года постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от № 2006 года

Минск
2006

СОДЕРЖАНИЕ

I.	Редакционный совет Государственной Фармакопеи Республики Беларусь		
II.	Список авторов		
III.	Список организаций, учреждений и предприятий Республики Беларусь, принимавших участие в разработке Государственной Фармакопеи Республики Беларусь		
ОБЩИЕ СТАТЬИ			
1.	**ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ**		
1.1.	Общие положения		
1.2.	Другие положения, распространяющиеся на общие и частные фармакопейные статьи		
1.3.	Общие фармакопейные статьи		
1.4.	Частные фармакопейные статьи		
1.5.	Сокращения и обозначения		
1.6.	Единицы международной системы (СИ), используемые в Фармакопейных статьях, и их соответствие другим единицам		
# 1.7.	Отбор проб		
2.	**МЕТОДЫ АНАЛИЗА**		
2.1.	ОБОРУДОВАНИЕ		
	2.1.1.	Каплемер	
	2.1.2.	Сравнительная таблица пористости стеклянных фильтров	
	2.1.3.	Лампы с ультрафиолетовым излучением для аналитических целей	
	2.1.4.	Сита	
	2.1.5.	Пробирки для сравнительных испытаний	
	2.1.6.	Индикаторные трубки	
2.2.	ФИЗИЧЕСКИЕ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ		
	2.2.1.	Определение прозрачности и степени мутности жидкостей	
	2.2.2.	Определение степени окрашивания жидкостей	
	2.2.3.	Потенциометрическое определение pH	
	2.2.4.	Зависимость между реакцией раствора, приблизительным значением pH и цветом индикаторов	
	2.2.5.	Относительная плотность	
	2.2.6.	Показатель преломления (индекс рефракции)	
	2.2.7.	Оптическое вращение	
	2.2.8.	Вязкость	
	2.2.9.	Метод капиллярной вискозиметрии	
	2.2.10.	Метод ротационной вискозиметрии	
	2.2.11.	Температурные пределы перегонки	
	2.2.12.	Температура кипения	
	2.2.13.	Определение воды методом отгонки	
	2.2.14.	Температура плавления – капиллярный метод	
	2.2.15.	Температура плавления – открытый капиллярный метод	
	2.2.16.	Температура плавления – метод мгновенного плавления	
	2.2.17.	Температура каплепадения	

	2.2.17.	Температура затвердевания	
	2.2.19.	Амперометрическое титрование	
	2.2.20.	Потенциометрическое титрование	
	2.2.21.	Флуориметрия	
	2.2.22.	Атомно-эмиссионная спектрометрия	
	2.2.23.	Атомно-абсорбционная спектрометрия	
	2.2.24.	Абсорбционная спектрофотометрия в инфракрасной области	
	2.2.25.	Абсорбционная спектрофотометрия а ультрафиолетовой и видимых областях	
	2.2.26.	Бумажная хроматография	
	2.2.27.	Тонкослойная хроматография	
	2.2.28.	Газовая хроматография	
	2.2.29.	Жидкостная хроматография	
	2.2.30.	Эксклюзионная хроматография	
	2.2.31.	Электрофорез	
	2.2.32.	Потеря в массе при высушивании	
	2.2.33.	Спектрометрия ядерного магнитного резонанса	
	2.2.34.	Термогравиметрия	
	2.2.35.	Осмоляльность	
	2.2.36.	Потенциометрическое определение концетрации ионов с использованием ионселективных электродов	
	2.2.37.	Рентгенофлуоресцентная спектрометрия	
	2.2.38.	Удельная электропроводность	
	2.2.39.	Молекулярно-массовое разделение декстранов	
	2.2.41.	Круговой дихроизм	
	2.2.42.	Плотность твердых тел	
	2.2.43.	Масс-спектрометрия	
	2.2.45.	Сверхкритическая флюидная хроматография	
	2.2.46.	Хроматографические методы разделения	
	2.2.47.	Капиллярный электрофорез	
	2.2.48.	Рамановская спектрометрия (# спектрометрия комбинационного рассеяния)	
	2.2.54.	Изоэлектрическое фокусирование	
2.3.	ПОДЛИННОСТЬ (ИДЕНТИФИКАЦИЯ)		
	2.3.1.	Реакции подлинности (идентификации) на ионы и функциональные группы	
	2.3.2.	Идентификация жирных масел методом тонкослойной хроматографии	
	2.3.3.	Идентификация фенотиазинов методом тонкослойной хроматографии	
	2.3.4.	Определение запаха	
2.4.	ИСПЫТАНИЯ НА ПРЕДЕЛЬНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ПРИМЕСЕЙ		
	2.4.1.	Аммония соли	
	2.4.2.	Мышьяк	
	2.4.3.	Кальций	
	2.4.4.	Хлориды	
	2.4.5.	Фториды	
	2.4.6.	Магний	
	2.4.7.	Магний и щелочноземельные металлы	
	2.4.8.	Тяжелые металлы	

	2.4.9.	Железо	
	2.4.10.	Свинец в сахарах	
	2.4.11.	Фосфаты	
	2.4.12.	Калий	
	2.4.13.	Сульфаты	
	2.4.14.	Сульфатная зола	
	2.4.15.	Никель в полиолах	
	2.4.16.	Общая зола	
	2.4.17.	Алюминий	
	2.4.18.	Свободный формальдегид	
	2.4.19.	Щелочные примеси в жирных маслах	
	2.4.20.	Антиоксиданты в жирных маслах	
	2.4.21.	Посторонние масла в жирных маслах методом тонкослойной хроматографии	
	2.4.22.	Посторонние жирные кислоты в маслых методом газовой хроматографии	
	2.4.23.	Стерины в жирных маслах	
	2.4.24.	Идентификация остаточных растворителей и контроль их количеств	
	2.4.25.	Остаточные количества этиленоксида и диоксана	
	2.4.26.	N,N-диметиланилин	
	2.4.27.	Никель в гидрогенизированных растительных маслах	
	2.4.28.	2-Этилгексановая кислота	
	#2.4.29.	Цинк	
	#2.4.30.	Легко обугливающиеся вещества	
2.5.	МЕТОДЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ		
	2.5.1.	Кислотное число	
	2.5.2.	Эфирное число	
	2.5.3.	Гидроксильное число	
	2.5.4.	Йодное число	
	2.5.5.	Перекисное (пероксидное) число	
	2.5.6.	Число омыления	
	2.5.7.	Неомыляемые вещества	
	2.5.8.	Определение аминного азота в соединениях, которые содержат первичную ароматическую аминогруппу	
	2.5.9.	Определение азота после минерализации серной кислотой	
	2.5.10.	Метод сжигания в колбе с кислородом	
	2.5.11.	Комплексометрическое титрование	
	2.5.12.	Вода: полумикрометод (# Метод К.Фишера)	
	2.5.13.	Алюминий в адсорбированных вакцинах	
	2.5.14.	Кальций в адсорбированных вакцинах	
	2.5.15.	Фенол в иммуносыворотках и вакцинах	
	2.5.16.	Белок в полисахаридных вакцинах	
	2.5.17.	Нуклеиновые кислоты в полисахаридных вакцинах	
	2.5.18.	Фосфор в полисахаридных вакцинах	
	2.5.19.	О-Ацетил в полисахаридных вакцинах	
	2.5.20.	Гексозамины в полисахаридных вакцинах	
	2.5.21.	Метилпентозы в полисахаридных вакцинах	
	2.5.22.	Уроновые кислоты в полисахаридных вакцинах	
	2.5.23.	Сиаловая кислота в полисахаридных вакцинах	

	2.5.24.	Диоксид углерода в газах	
	2.5.25.	Оксид углерода в газах	
	2.5.26.	Оксид азота и диоксид азота а газах	
	2.5.27.	Кислород в газах	
	2.5.28.	Вода в газах	
	2.5.29.	Сернистый газ	
	2.5.30.	Окисляющие вещества	
	2.5.31.	Рибоза в полисахаридных вакцинах	
	2.5.32.	Вода: микроопределение	
	2.5.33.	Общий белок	
	2.5.34.	Уксусная кислота в синтетических пептидах	
	#2.5.35.	Титрование в неводных растворителях	
2.6.	БИОЛОГИЧЕСКИЕ ИСПЫТАНИЯ		
	2.6.1.	Стерильность	
	2.6.2.	Микобактерии	
	2.6.3.	Испытания на посторонние вирусы с использованием куриных эмбрионов	
	2.6.4.	Испытание на вирусы лейкоза	
	2.6.5.	Испытания на посторонние вирусы с использованием клеточных культур	
	2.6.6.	Испытание на посторонние агенты с использованием цыплят	
	2.6.7.	Микоплазмы	
	2.6.8.	Пирогенность	
	2.6.9.	Аномальная токсичность	
	2.6.10.	Гистамин	
	2.6.11.	Депрессорные вещества	
	2.6.12.	Микробиологические испытания нестерильной продукции (суммарное количество жизнеспособных аэробов)	
	2.6.13.	Микробиологические испытания нестерильной продукции (испытания на наличие специфических микроорганизмов)	
	2.6.14.	Бактериальные эндотоксины	
	2.6.15.	Активатор прекалликреина	
	2.6.16.	Испытания на посторонние агенты в вирусных вакцинах для медицинского применения	
	2.6.17.	Испытание на антикомплементарную активность иммуноглобулина	
	2.6.18.	Испытание живых вирусных вакцин на нейровирулентность	
	2.6.19.	Испытание пероральной вакцины полиомиелита на нейровирулентность	
	2.6.20.	Анти-А и анти-В гемагглютинины	
	2.6.21.	Методы амплификации нуклеиновых кислот	
	2.6.22.	Активированные факторы коагуляции	
2.7.	БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ		
	2.7.1.	Иммунохимические методы	
	2.7.2.	Количественное определение антибиотиков	
	2.7.3.	Количественное определение кортикотропина	

	2.7.4.	Количественное определение фактора свертывания крови VIII	
	2.7.5.	Количественное определение гепарина	
	2.7.6.	Количественное определение вакцины дифтерии (адсорбированной)	
	2.7.7.	Количественное определение вакцины коклюша	
	2.7.8.	Количественное определение вакцины столбняка (адсорбированной)	
	2.7.9.	Определение функционального состояния Fc-фрагмента иммуноглобулина	
	2.7.10.	Количественное определение фактора свертывания крови человека VII	
	2.7.11.	Количественное определение фактора свертывания крови человека IX	
	2.7.12.	Количественное определение гепарина в концентратах факторов свертывания	
	2.7.13.	Количественное определение человеческого анти-D-иммуноглобулина	
	2.7.14.	Количественное определение антигенной (иммуногенной) активности вакцины гепатита A	
	2.7.15.	Количественное определение вакцины гепатита B (rDNA)	
	2.7.16.	Количественное определение вакцины коклюша (бесклеточной)	
	2.7.17.	Количественное определение человеческого антитромбина III	
	2.7.18.	Количественное определение фактора свертывания крови человека II	
	2.7.19.	Количественное определение фактора свертывания крови человека X	
	2.7.20.	Количественное определение инактивированной вакцины полиомиелита in vivo	
	2.7.21.	Количественное определение фактора свертывания крови человека XI	
	#2.7.23.	Определение биологической активности инсулина	
2.8.	МЕТОДЫ АНАЛИЗА ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ И ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ ИЗ НЕГО		
	2.8.1.	Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте	
	#2.8.2.	Допустимые примеси	
	#2.8.3.	Техника макроскопического и микроскопического анализа	
	2.8.4.	Коэффициент набухания	
	2.8.5.	Определение воды в эфирных маслах	
	2.8.6.	Посторонние эфиры в эфирных маслах	
	2.8.7.	Жирные и минеральные масла в эфирных маслах	
	2.8.8.	Запах и вкус эфирных масел	
	2.8.9.	Остаток после выпаривания эфирного масла	
	2.8.10.	Растворимость эфирных масел в спирте	
	2.8.11.	Определение 1,8-цинеола в эфирных маслах	
	2.8.12.	Определение эфирного масла	
	2.8.13.	Остаточные количества пестицидов	

	2.8.14.	Определение дубильных веществ	
	2.8.15.	Определение показателя горечи	
	2.8.16.	Сухой остаток экстрактов	
	2.8.17.	Потеря в массе при высушивании экстракта	
	#2.8.18.	Определение содержания экстрактивных веществ	
	#2.8.19.	Правила приемки и методы отбора проб	
	#2.8.20.	Определение содержания токсических веществ методом атомно-абсорбционной спектроскопии	
	#2.8.22.	Определение содержания радионуклидов	
2.9.	ФАРМАЦЕВТИЧЕСКО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ИСПЫТАНИЯ		
	2.9.1.	Распадаемость таблеток и капсул	
	2.9.2.	Распадаемость суппозиториев и пессариев	
	2.9.3.	Тест “Растворение” для твердых дозированных форм	
	2.9.4.	Тест “Растворение” для трансдермальных пластырей	
	2.9.5.	Однородность массы для единицы дозированного лекарственного средства	
	2.9.6.	Однородность содержания действующего вещества в единице дозированного лекарственного средства	
	2.9.7.	Прочность таблеток без оболочки на истирание	
	2.9.8.	Прочность таблеток на сжатие	
	2.9.9.	Измерение консистенции методом пенетрометрии	
	2.9.10.	Содержание этанола	
	2.9.11.	Испытание на содержание метанола и 2-пропанола	
	2.9.12.	Ситовой анализ	
	2.9.13.	Определение размера частиц методом микроскопии	
	2.9.14.	Удельная площадь поверхности	
	2.9.15.	Насыпной объем	
	2.9.16.	Сыпучесть	
	2.9.17.	Определение извлекаемого объема парентеральных лекарственных средств	
	2.9.18.	Лекарственные средства для ингаляций: аэродинамическое испытание мелких частиц	
	2.9.19.	Загрязнение механическими включениями: невидимые частицы	
	2.9.20.	Загрязнение механическими включениями: видимые частицы	
	2.9.21.	Загрязнение механическими включениями: метод микроскопии	
	2.9.22.	Определение времени деформации липофильных суппозиториев	
	2.9.23.	Определение плотности твердых частиц при помощи пикнометра	
	2.9.24.	Устойчивость суппозиториев и пессариев к разрушению	
	2.9.25.	Высвобождение активного вещества из лекарственных жевательных резинок	
	2.9.26.	Определение удельной площади поверхности методом газовой адсорбции	
	2.9.27.	Однородность массы одной дозы высвобожденной из многодозового контейнера	
	2.9.28.	Определение массы или объема содержимого	

		контейнера для жидких и мягких лекарственных средств	
3.	**МАТЕРИАЛЫ И КОНТЕЙНЕРЫ**		
3.1.	МАТЕРИАЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА КОНТЕЙНЕРОВ		
	3.1.1.	Материалы, используемые для производства контейнеров для человеческой крови и компонентов крови	
	3.1.1.1.	Материалы на основе пластифицированного поливинилхлорида, используемые для производства контейнеров для человеческой крови и ее компонентов	
	3.1.1.2.	Материалы на основе пластифицированного поливинилхлорида для трубок, используемых в комплектах для переливания крови и компонентов крови	
	3.1.3.	Полиолефины	
	3.1.4.	Полиэтилен без добавок для контейнеров для парентеральных и офтальмологических лекарственных средств	
	3.1.5.	Полиэтилен с добавками для контейнеров для парентеральных и офтальмологических лекарственных средств	
	3.1.6.	Полипропилен для контейнеров и укупорочных материалов для парентеральных и офтальмологических лекарственных средств	
	3.1.7.	Полиэтиленвинилацетат для контейнеров и трубок для лекарственных средств для парентерального питания	
	3.1.8.	Силиконовое масло, используемое в качестве смазывающей добавки	
	3.1.9.	Силиконовые эластомеры для укупорочных средств и трубок	
	3.1.10.	Материалы на основе непластифицированного поливинилхлорида для контейнеров для неинъекционных водных растворов	
	3.1.11.	Материалы на основе непластифицированного поливинилхлорида для контейнеров для твердых лекарственных форм для перорального применения	
	3.1.13.	Добавки к пластмассе	
	3.1.14.	Материалы на основе пластифицированного поливинилхлорида для контейнеров для водных растворов для внутривенного применения	
	3.1.15.	Полиэтилентерефталат для контейнеров для лекарственных средств для непарентерального применения	
3.2.	КОНТЕЙНЕРЫ		
	3.2.1.	Стеклянные контейнеры для фармацевтического использования	
	3.2.2.	Пластмассовые контейнеры и укупорочные средства для фармацевтического использования	
	3.2.2.1.	Пластмассовые контейнеры для водных растворов для	

		парантерального применения	
	3.2.3.	Стерильные пластмассовые контейнеры для человеческой крови и ее компонентов	
	3.2.4.	Пустые стерильные контейнеры из пластифицированного поливинилхлорида для человеческой крови и ее компонентов	
	3.2.5.	Стерильные контейнеры из пластифицированного поливинилхлорида для человеческой крови, содержащие раствор антикоагулянта	
	3.2.6.	Комплексы для переливания крови и компонентов крови	
	3.2.8.	Стерильные одноразовые пластмассовые шприцы	
	3.2.9.	Резиновые укупорочные средства для контейнеров, предназначенных для водных лекарственных средств для парантерального применения, порошков и лиофилизированных порошков	
4.	**РЕАКТИВЫ**		
4.1.	РЕАКТИВЫ, ЭТАЛОННЫЕ РАСТВОРЫ, БУФЕРНЫЕ РАСТВОРЫ		
	4.1.1.	Реактивы	
	4.1.2.	Эталонные растворы для испытаний на предельное содержание примесей	
	4.1.3.	Буферные растворы	
4.2.	РЕАКТИВЫ, ТИТРОВАННЫЕ РАСТВОРЫ ДЛЯ ОБЪЕМНОГО АНАЛИЗА		
	4.2.1.	Исходные стандартные вещества для титрованных растворов	
	4.2.2.	Титрованные растворы	
5.	**ОБЩИЕ ТЕКСТЫ**		
5.1.	ОБЩИЕ ТЕКСТЫ ПО СТЕРИЛИЗАЦИИ		
	5.1.1.	Методы приготовления стерильных продуктов	
	5.1.2.	Биологические индикаторы стерилизации	
	5.1.3.	Эффективность антимикробных консервантов	
	5.1.4.	Микробиологическая чистота лекарственных средств	
	5.1.5.	Применение F_o концепции при стериализации паром водных растворов	
5.2.	ОБЩАЯ ИНФОРМАЦИЯ О ВАКЦИНАХ		
	5.2.1.	Общепринятая терминология	
	5.2.2.	Стаи кур, не имеющих конкретных патогенов и используемые для проивздоства вакцин и контроля их качества	
	5.2.3.	Субстраты клеток для производства вакцин, используемых людьми	
	5.2.6.	Оценка безопасности вакцин	
	5.2.7.	Оценка эффективности вакцин	
	5.2.8.	Снижение риска передачи возбудителей губчатой энцефалопатии через лекарственные средства	
5.3.	СТАТИСТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ОБРАБОТКИ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА		
	5.3.1.	Статистический анализ результатов биологических исследований и количественных определений	
	1.	Введение	

		1.1.	Общиеположения и точность	
	2.	Рандомизация и независимость конкретных исследований		
	3.	Количественные определения, основанные на количественных эффектах		
		3.1.1.	Общие принципы	
		3.1.2.	Постоянные рутинные количественные определения	
		3.1.3.	Вычисления и ограничения	
		3.2.	Модель параллельных линий	
		3.2.1.	Введение	
		3.2.2.	План количественного определения	
		3.2.3.	Дисперсионный анализ	
		3.2.4.	Исследования достоверности	
		3.2.5.	Оценка активности и границ доверительных интервалов	
		3.2.6.	Пропущенные результаты	
		3.3.	Модель угловых коэффициентов	
		3.3.1.	Введение	
		3.3.2.	План количественного определения	
		3.3.3.	Дисперсионный анализ	
		3.3.4.	Исследования достоверности	
		3.3.5.	Оценка активности и границ доверительных интервалов	
	4.	Тесты с альтернативным типом эффекта		
		4.1.	Введение	
		4.2.	Метод пробит-анализа	
		4.2.1.	Подготовка рабочих таблиц результатов	
		4.2.2.	Исследования достоверности	
		4.2.3.	Оценка активности границ доверительных интервалов	
		4.2.4.	Недействительные количественные определения	
		4.3.	Метод логит-анализа	
		4.4.	Другие формы кривой	
		4.5.	Медианная эффективная доза	
	5.	Примеры		
		5.1.	Метод параллельных линий	
		5.1.1.	Двухдозовое многократное количественное определение с использованием схемы полной рандомизации	
		5.1.2.	Трехдозовое количественное определение с использованием схемы латинских квадратов	
		5.1.3.	Четырехдозовая схема рандомизированных блоков	
		5.1.4.	Пятидозовое многократное количественное определение с использованием схемы полной рандомизации	
		5.1.5.	Двойная перекрестная схема	
		5.2.	Модель угловых коэффициентов	
		5.2.1.	(0,3,3) Схема полной рандомизации	

		5.2.2.	(0,4,4,4) Схема поной рандомизации	
		5.3.	Альтернативные эффекты	
		5.3.1.	Использование метода пробит-анализа при сравнении испытуемого препарата со стандартным	
		5.3.2.	Использование метода логит-анализа и других аналогичных методов количественного определения при сравнении испытуемого препарата со стандартным	
		5.3.3.	Определение $ЭД_{50}$ вещества, используя метод пробит-анализа	
	6.	Объединение результатов количественного определения		
		6.1.	Введение	
		6.2.	Взвешенное объединение результатов количественного определения	
		6.2.1.	Расчет весовых коэффициентов	
		6.2.2.	Однородность оценок активности	
		6.2.3.	Расчет взвешенного среднего и границ доверительных интервалов	
		6.2.4.	Взвешенное среднее и доверительные интервалы отклонения в пределах количественного определения и между ними	
		6.3.	Невзвешенное объединение результатов количественного определения	
		6.4.	Пример определения взвешенной средней активности с доверительным интервалом	
	7.	Дополнение		
		7.1.	Общие линейные модели	
		7.2.	Неоднородность дисперсии	
		7.3.	Выбросы и устойчивость методов в работе (робастность)	
		7.4.	Ошибки корреляции	
	8.	Таблицы и процедуры генерирования		
		8.1.	F-Распределение	
		8.2.	t-Распределение	
		8.3.	Распределение X^2	
		8.4.	Ф-Распределение (кумулятивная стандартная функция нормального распределения)	
		8.5.	Случайные размещения	
		8.6.	Латинские квадраты	
	9.	Принятые обозначения		
	# 5.3.2.	Статистический анализ результатов химического эксперимента		
	1.	Выборка		
		1.1.	Среднее значение и дисперсия	
		1.2.	Проверка однородности выборки, Исключение выпадающих значений вариант	
		1.3.	Доверительные интервалы и оценка их величины	
		1.4.	Односторонние и двусторонние	

			доверительные интервалы	
	2.	Метрологические характеристики методики анализа		
		2.1.	Объединение выборок	
		2.1.1.	Объединенная дисперсия и объединенное среднее	
		2.1.2.	Критерий Бартлета	
		2.1.3.	Критерий Кохрейна	
		2.2.	Проверка наличия значимой систематической погрешности	
	3.	Сравнение двух методик анализа по воспроизводимости		
	4.	Метрологическая характеристика среднего результата		
	5.	Сравнение средних результатов двух выборок		
		5.1.	Различие дисперсий S_1^2 и S_2^2 статистически недостоверно	
		5.2.	Различие дисперсий S_1^2 и S_2^2 статистически достоверно	
		5.3.	Известно точное значение величины А	
	6.	Интерпретация результатов анализа, полученных с помощью метрологически аттестованной методики		
		6.1.	Оценка сходимости результатов параллельных определений	
		6.2.	Определение необходимого числа параллельных определений	
		6.3.	Гарантия качества продукции	
	7.	Расчет и статистическая оценка параметров линейной зависимости		
	8.	Последовательная схема статистического анализа результатов химических измерений		
	9.	Примеры		
		9.1.	Вычисление среднего значения и дисперсии	
		9.2.	Проверка однородности малой выборки	
		9.3.	Вычисление доверительных интервалов и неопределенностей измерений	
		9.4.	Проверка гипотезы равенства дисперсий	
		9.4.1.	Объединение результатов выборок разного объема	
		9.4.2.	Объединение результатов выборок одинакового объема	
		9.5.	Сравнение двух методик анализа по воспроизводимости	
		9.6.	Сравнение средних результатов двух выборок	
		9.7.	Оценка качества продукции	
		9.8.	Контроль содержания салициловой кислоты в салициловом спирте посредством секвенционального анализа	
	10.	Расчет неопределенности функции нескольких случайных переменных		
		10.1.	Линейная модель	
		10.1.1.	Взвешенное среднее	
		10.2.	Подход Уэлча-Сатертуэйта	

		10.3.	Примеры расчетов неопределенности функции нескольких переменных	
	11.	Приложения		
	# 5.3.3.	Валидация аналитических методик испытаний		
5.4.	ОСТАТОЧНЫЕ КОЛИЧЕСТВА ОРГАНИЧЕСКИХ РАСТВОРИТЕЛЕЙ			
5.5.	АЛКОГОЛЕМЕТРИЧЕСКИЕ ТАБЛИЦЫ			
5.6.	ОТЧЕТ ОБ ИССЛЕДОВАНИИ ИНТЕРФЕРОНОВ			
5.7.	ТАБЛИЦА ФИЗИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК РАДИОНУКЛИДОВ, УПОМИНАЕМЫХ В ФАРМАКОПЕЕ			
# 5.8.	БИОДОСТУПНОСТЬ И БИОЭКВИВАЛЕНТНОСТЬ ГЕНЕРИЧЕСКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ			
# 5.9.	ПЕРЕЧЕНЬ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ (ЛЕЧЕБНЫХ) ДОЗ СРЕДСТВ НА ОСНОВЕ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ			
6.	**ОБЩИЕ СТАТЬИ НА ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ФОРМЫ И СУБСТАНЦИИ**			
	ОСНОВНЫЕ ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ			
	ВАКЦИНЫ ДЛЯ МЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ			
	ГЛАЗНЫЕ ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА			
		Глазные капли		
		Глазные примочки		
		Порошки для приготовления глазных капель и пpримочек		
		Глазные мягкие лекарственные средства		
		Глазные вставки		
	ГРАНУЛЫ			
		Гранулы “шипучие”		
		Гранулы, покрытые оболочкой		
		Гранулы кишечно-растворимые		
		Гранулы с модифицированным высвобождением		
	ЖЕВАТЕЛЬНЫЕ ЛЕКАРСТВЕННЫЕ РЕЗИНКИ			
	ЖИДКИЕ ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА ДЛЯ НАРУЖНОГО ПРИМЕНЕНИЯ			
		Шампуни		
		Пены для кожи		
	ЖИДКИЕ ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА ДЛЯ ОРАЛЬНОГО ПРИМЕНЕНИЯ			
		Оральные растворы, эмульсии и суспензии		
		Порошки и гранулы для приготовления оральных растворов и суспензий		
		Оральные капли		
		Порошки для приготовления оральных капель		
		Сиропы		
	ИММУННЫЕ СЫВОРОТКИ ДЛЯ МЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ			
	КАПСУЛЫ			
		Капсулы твердые		
		Капсулы мягкие		
		Капсулы кишечно-растворимые		
		Капсулы с модифицированным высвобождением		
		Облатки		

	ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА ДЛЯ ВАГИНАЛЬНОГО ПРИМЕНЕНИЯ		
		Пессарии	
		Вагинальные таблетки	
		Вагинальные капсулы	
		Вагинальные растворы, эмульсии и суспензии	
		Таблетки для приготовления вагинальных растворов или суспензий	
		Мягкие лекарственные средства для вагинального применения	
		Вагинальные пены	
		Вагинальные тампоны	
	ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА ДЛЯ ИНГАЛЯЦИЙ		
		Жидкие лекарственные средства для ингаляций	
		Порошки для ингаляций	
	ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА, НАХОДЯЩИЕСЯ ПОД ДАВЛЕНИЕМ		
	ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА ДЛЯ ОРОШЕНИЯ		
	ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА ДЛЯ ПАРЕНТЕРАЛЬНОГО ПРИМЕНЕНИЯ		
		Инъекционные лекарственные средства	
		Инфузии	
		Концентраты для приготовления лекарственных средств и инфузий	
		Порошки для приготовления инъекционных лекарственных средств и инфузий	
		Имплантаты	
		# Салфетки	
	ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА ДЛЯ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ПОЛОСТИ РТА		
		Растворы для полоскания горла	
		Растворы для полоскания рта	
		Растворы для десен	
		Растворы и суспензии для слизистой оболочки полости рта	
		Мягкие лекарственные средства для слизистой оболочки полости рта	
		Капли и спреи для слизистой оболочки полости рта и сублингвальные спреи	
		Леденцы и пастилки	
		Прессованные леденцы	
		Сублингвальные таблетки и таблетки для медленного растворения в щечном кармане	
		Капсулы для слизистой оболочки полости рта	
		Слизистые адгезивные лекарственные средства	
	ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА ДЛЯ РЕКТАЛЬНОГО ПРИМЕНЕНИЯ		
		Суппозитории	
		Ректальные капсулы	
		Ректальные растворы, эмульсии и суспензии	

		Порошки и таблетки для приготовления ректальных растворов или суспензий	
		Мягкие лекарственные средства для ректального применения	
		Ректальные пены	
		Ректальные тампоны	
	ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА НА ОСНОВЕ АЛЛЕРГЕНОВ		
	ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА НА ОСНОВЕ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ		
		Лекарственное растительное сырье	
		Растительные чаи	
		Экстракты	
		Жидкие экстракты	
		Густые экстракты	
		Сухие экстракты	
		Настойки	
	МЯГКИЕ ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА ДЛЯ МЕСТНОГО ПРИМЕНЕНИЯ		
		Мази	
		Кремы	
		Гели	
		Пасты	
		Линименты	
		Припарки	
	НАЗАЛЬНЫЕ ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА		
		Назальные капли и жидкие назальные спреи	
		Назальные порошки	
		Назальные мягкие лекарственные средства	
		Назальные промывки	
		Назальные палочки	
	ПАЛОЧКИ		
	ПЕНЫ МЕДИЦИНСКИЕ		
	ПОРОШКИ ДЛЯ НАРУЖНОГО ПРИМЕНЕНИЯ		
	ПОРОШКИ ДЛЯ ОРАЛЬНОГО ПРИМЕНЕНИЯ		
		Порошки “шипучие”	
	ПРОДУКТЫ ФЕРМЕНТАЦИИ		
	ПРОДУКТЫ, КОТОРЫЕ МОГУТ БЫТЬ ПЕРЕНОСЧИКАМИ ГУБЧАТОЙ ЭНЦЕФАЛОПАТИИ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ		
	РАДИОАКТИВНЫЕ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ ПРЕПАРАТЫ		
	РАСТИТЕЛЬНЫЕ ЖИРНЫЕ МАСЛА		
	СУБСТАНЦИИ ДЛЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ		
	ТАБЛЕТКИ		
		Таблетки без оболочки	
		Таблетки, покрытые оболочкой	
		Таблетки “шипучие”	
		Таблетки растворимые	
		Таблетки диспергируемые	
		Таблетки, диспергируемые в полости рта	
		Таблетки с модифицированным высвобождением	
		Таблетки кишечно-растворимые	

		Таблетки для применения в полости рта	
	ТАМПОНЫ МЕДИЦИНСКИЕ		
	ТРАНСДЕРМАЛЬНЫЕ ПЛАСТЫРИ		
	УШНЫЕ ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА		
		Ушные капли и спреи	
		Ушные мягкие лекарственные средства	
		Ушные порошки	
		Ушные промывки	
		Ушные тампоны	

Редакционный совет
Государственной Фармакопеи Республики Беларусь

Годовальников Г.В. – председатель редакционного совета
Шеряков А.А. – заместитель председателя - координатор

Члены редакционного совета

Общие статьи
Годовальников Г.В., к.ф.н.
Шеряков А.А., к.ф.н.

Оборудование
Шеряков А.А., к.ф.н.

Физические и физико-химические методы
Жебентяев А.И., д.ф.н.
Жерносек А.К., к.ф.н.
Кудрявцева С.И.
Шеряков А.А., к.ф.н.

Подлинность (идентификация)
Кугач В.В., к.ф.н.
Шеряков А.А., к.ф.н.

Испытания на предельное содержание примесей
Кудрявцева С.И.
Шеряков А.А., к.ф.н.

Методы количественного определения
Добыш И.А.
Коцур О.М.
Пленина Л.В., к.б.н.

Биологические испытания
Александрова Н.В.
Бородич Н.В.
Воробьев А.Н.
Воробьева Л.И.
Дедюшко Н.А.
Казючиц О.А., к.б.н.
Климович О.М., к.б.н.
Левданская М.П.
Литвинова Е.В., к.б.н.
Никитина Т.А.
Петров П.Т., к.х.н.
Скрипко А.Д.
Солодкова Г.С.
Трухачева Т.В., к.т.н.

Биологические методы количественного определения
Атаманенко Л.Т.
Бородич Н.В.
Воробьев А.Н.
Дедюшко Н.А.
Казючиц О.А., к.б.н.
Климович О.М., к.б.н.
Петров П.Т., к.х.н.
Трухачева Т.В., к.т.н.
Федерякина Т.Д.

Методы фармакогнозии
Бузук Г.Н., д.ф.н.
Гурина Н.С., д.б.н.
Жулина Н.В.
Солодухина Л.А.
Стреха И.С.

Фармацевтическо-технологические испытания
Новик О.А.
Яремчук А.А., к.ф.н.

Материалы и контейнеры
Покачайло Л.А., к.ф.н.
Ридевская Н.В.
Свихнушина Е.В.

Реактивы
Голик Г.И.
Шеряков А.А., к.ф.н.

Общие тексты по стерилизации
Клещевник О.Н.
Людчик Е.В.

Статистические методы обработки результатов анализа
Алексеев Н.А., к.ф.н.
Исайчук Д.В.
Логовой И.И.
Шеряков А.А., к.ф.н.

Остаточные количества органических растворителей
Кудрявцева С.И.
Шеряков А.А., к.ф.н.

Алкоголеметрические таблицы
Новик О.А.
Шеряков А.А., к.ф.н.

Отчет об исследовании интерферонов
Пленина Л.В., к.б.н.

Таблица физических характеристик радионуклидов
Клещевник О.Н.
Людчик Е.В.

Биодоступность и биоэквивалентность генерических лекарственных средств
Алексеев Н.А., к.ф.н.
Воронов Г.Г., к.м.н.
Годовальников Г.В., к.ф.н.
Рождественский Д.А.

Перечень терапевтических (лечебных) доз средств на основе лекарственного растительного сырья
Рождественский Д.А.

Общие статьи на лекарственные формы
Голик Г.И.
Марченко С.И.
Новик О.А.
Яремчук А.А., к.ф.н.
Шеряков А.А., к.ф.н.

Список авторов

Александрова Н.В. Алексеев Н.А. Атаманенко Л.Т. Багнюк Е.Ф. Батуро Т.В. Бернович Л.С. Боровик А.П. Бородич Н.В. Бузук Г.Н. Васькина Н.Л. Войтович Н.Г. Воробьев А.Н. Воробьева Л.И. Воронов Г.Г. Гайдук С.С. Гертман О.П. Годовальников Г.В. Голик Г.И. Грибанова В.П. Гурина Н.С. Дедюшко Н.А. Добыш И.А. Дорошко Д.Г. Еремейчик И.В. Жебентяев А.И. Жерносек А.К. Жулина Н.В. Завадская И.И. Исайчук Д.В. Казючиц О.А. Квачева З.Б. Коцур О.М. Кенькова Н.Н. Клещевник О.Н. Климович О.М. Кугач В.В. Кудрявцева С.И. Кураш Т.П. Левданская М.П. Литвинова Е.В. Логовой И.И. Людчик Е.В. Макоед И.С. Малыгина Н.А. Мороз О.Е. Марченко С.И. Микушкин А.С. Михаленок Н.В. Никитина Т.А.	Никифорова О.О. Новик О.А. Петров П.Т. Пленина Л.В. Позняк И.А. Покачайло Л.И. Полещук Н.Н. Посконная Л.Б. Потапнев М.П. Пусь Л.А. Рафалович Л.И. Ридевская Н.В. Родионова Р.А. Рождественский Д.А. Рябкова Л.П. Сафонова Е.Д. Свентицкая Л.И. Свихнушина Е.В. Селицкий В.Е. Скобейко Г.С. Скрипко А.Д. Солодкова Г.С. Солодухина Л.А. Стреха И.С. Трухачева Т.В. Федерякина Т.Д. Фомичева Н.В. Хишова О.М. Хлюстов С.В. Холина Н.А. Хусаинова Е.В. Шеряков А.А. Шуть Н.В. Яковлев И.В. Яремчук А.А. Ящук Т.И.

Список
Организаций, учреждений и предприятий Республики Беларусь, принимавших участие в разработке Государственной Фармакопеи Республики Беларусь

Витебский государственный медицинский университет

ГУ «Республиканский научно-практический центр гематологии и трансфузиологии»

ГУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии»

РУП «Белмедпрепараты»

РУП «Борисовский завод медицинских препаратов»

РУП «Несвижский завод медицинских препаратов»

РУП «Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении»

УП «Диалек»

УП «Минскинтеркапс»

СП ООО «Фармлэнд»

ООО «Падис'С»

ОДО «Фармион»

ООО «Фармтехнология»

Отдел качества аптечного склада ТП РУП «БелФармация»

Контрольно-аналитическая лаборатория Брестского ТП РУП «Фармация»

Контрольно-аналитическая лаборатория Витебского ТП РУП «Фармация»

Контрольно-аналитическая лаборатория Гомельского ТП РУП «Фармация»

Контрольно-аналитическая лаборатория Гродненского ТП РУП «Фармация»

Контрольно-аналитическая лаборатория ТП РУП «Минская Фармация»

Контрольно-аналитическая лаборатория Могилевского ТП РУП «Фармация»

1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

1.1. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Положения статьи *«Общие сведения»* распространяются на все общие статьи, частные статьи и другие материалы Государственной Фармакопеи Республики Беларусь.

В материалах Государственной Фармакопеи Республики Беларусь слово «Фармакопея» без уточнений подразумевает Государственную Фармакопею Республики Беларусь. Наряду с этим для обозначения Государственной Фармакопеи Республики Беларусь может быть использовано также официальное сокращение ГФ РБ.

Термин «компетентный уполномоченный орган» означает Министерство здравоохранения Республики Беларусь и Республиканское унитарное предприятие «Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении» в соответствии с его компетенцией.

Все общие Фармакопейные статьи и монографии гармонизированы с Европейской фармакопией и построены в следующем формате:

- адаптированный перевод соответствующего материала Европейской Фармакопеи;
- национальные дополнительные испытания, информационные и иные материалы отмечены значком «#».

Ссылка в материалах Фармакопеи на какую-либо статью и/или ее раздел означает, что продукт соответствует требованиям этой статьи. Название статьи, на которую дается ссылка, и/или ее номер обычно выделены курсивом.

Готовое лекарственное средство должно соответствовать требованиям Фармакопеи на протяжении срока годности. Срок годности и дата, с которой он должен отсчитываться, согласовываются компетентным уполномоченным органом на основании экспериментальных исследований по стабильности данного готового лекарственного средства. Любой другой продукт (субстанция, вспомогательное вещество и др.) должен соответствовать требованиям конкретной Фармакопейной статьи на всем протяжении периода его использования.

Требования частной статьи являются обязательными, если нет специальных указаний в статье *«Общие сведения»* или в данной частной статье. Общие статьи становятся обязательными, когда на них приводится ссылка в той или иной монографии или общей статье, если только специально не указано, что ссылка приводится исключительно как информация или рекомендация.

Действующие вещества (субстанции), вспомогательные вещества, готовые лекарственные средства и другие продукты, описываемые в частных статьях Фармакопеи, предназначены для использования в медицине.

Нормативный документ по контролю качества производителя лекарственного средства может не содержать все тесты (испытания), приведенные в Фармакопее. Для подтверждения соответствия лекарственного средства требованиям Фармакопеи производитель при выпуске должен представить доказательства того, что лекарственное средство соответствует фармакопейному качеству исходя из результатов валидационных испытаний в сочетании с результатами контроля процесса производства данного лекарственного средства. Такой подход, если компетентные уполномоченные органы считают его обоснованным, не противоречит необходимости соответствия требованиям Фармакопеи.

Испытания и методики количественного определения, приведенные в Фармакопее, являются официальными методиками, однако по согласованию с компетентными уполномоченными органами могут использоваться и другие

методики, при условии, что они дают результаты, соответствующие фармакопейным методикам. В случае сомнений или разногласий решающей является фармакопейная методика.

Субстанции, вспомогательные вещества и другие продукты, на которые распространяются требования Фармакопеи, могут использоваться в разных целях (например, для получения парентеральных лекарственных средств или таблетированных лекарственных форм и т.п.). Если на этот счет нет указаний в соответствующей частной статье, ее требования распространяются на продукт независимо от целей его применения. В некоторых случаях, в частности, в случае вспомогательных веществ, частная статья может быть дополнена списком характеристик, которые являются важными для использования данного вещества; этот список прилагается в качестве информации и рекомендаций. Для информации могут также быть приведены методики контроля одной или нескольких таких характеристик.

Общая фармакопейная статья на ту или иную лекарственную форму распространяется на все лекарственные средства, изготовленные в виде этой лекарственной формы. Для конретного лекарственного средства требования соответствующей общей фармакопейной статьи не обязательно являются исчерпывающими и могут быть дополнены компетентным уполномоченным органом в частной статье.

Словосочетание *«если нет других указаний в частной статье»* (под частной статьей подразумевается частная статья ГФ РБ на субстанцию или аналитический нормативный документ, утвержденный уполномоченным органом) означает, что требования общей статьи должны быть выполнены, если только компетентный уполномоченный орган не внес в эти требования изменения, что указывается в частной статье.

В некоторых общих статьях и частных статьях Фармакопеи при описании реактива, микроорганизма, методики и т.д. используется термин «подходящий». Если при этом критерии их пригодности не сформулированы, то пригодность конкретных реактивов, методик и т.д., используемых в аналитической нормативной документации (АНД), должна быть обоснована перед компетентным уполномоченным органом.

1.2. ДРУГИЕ ПОЛОЖЕНИЯ, РАСПРОСТРАНЯЮЩИЕСЯ НА ОБЩИЕ И ЧАСТНЫЕ ФАРМАКОПЕЙНЫЕ СТАТЬИ

Количество вещества. При описании количественного определения или испытания с численно заданными пределами количество вещества, необходимое для проведения испытания может отклоняться в пределах ±10% от указанного количества. Необходимо взять точную навеску анализируемого вещества (или отмерить его каким-либо другим способом) и все вычисления производить для этого точного количества вещества.

Если в частной статье не указана точность взятия навески, вещество должно бьть точно взвешено («точная навеска») таким образом, чтобы неточность взвешивания (сумма случайной и систематической ошибки) не превышала 0,1% от желаемого.

Точность взвешивания считается удовлетворительной, когда утроенное значение стандартного отклонения не менее чем десяти повторных взвешиваний деленное на массу навески не превышает 0,001. Для титрометрического определения взвешивание должно обеспечивать то количество значащих цифр в навеске, которое соответствует количеству значащих цифр в концентрации титранта.

Если пределы испытания заданы не численно, а определяются путем сравнения со стандартом при тех же условиях, для испытания берут строго указанное количество вещества. Реактивы всегда берут в строго указанных количествах.

Если значения массы навесок или объемов не используют для дальнейших расчетов, то точность их взятия (отмеривания, отвешивания) должна согласовываться с указанной в статье точностью. Точность взвешивания должна быть ±5 единиц после последней указанной цифры; например, навеска 0,25 г может находиться в пределах от 0,245 г до 0,255 г, а навеска 0,2 г – от 0,15 г до 0,25 г. Объемы отмеривают следующим образом: если после десятичной запятой стоит 0 или число, заканчивающееся 0 (например, 10,0 мл или 0,50 мл), требуемый объем отмеривают с помощью пипетки, мерной колбы или бюретки. В остальных случаях можно использовать градуированный мерный цилиндр или градуированную пипетку. Микролитры отмеривают с помощью микропипетки или микрошприца.

Оборудование и аналитические операции. Стеклянная мерная посуда должна соответствовать требованиям класса А Международного стандарта, выпущенного Международной организацией по стандартизации (ISO) # или национального стандарта Республики Беларусь.

Аналитические операции, если нет других указаний, осуществляются при температуре от 15°C до 25°C.

Сравнительные испытания, если нет других указаний, проводят с использованием пробирок из бесцветного прозрачного нейтрального стекла с плоским основанием и внутренним диаметром 16 мм. Сравнивают равные объемы жидкостей на белом (или, при необходимости, на черном) фоне. Испытания проводят в рассеянном свете.

Если для проведения испытания или количественного определения требуется использовать растворитель с растворенным в нем индикатором и при этом не предусмотрен контрольный опыт, этот растворитель предварительно нейтрализуют по этому индикатору.

Контрольный опыт. Под контрольным опытом подразумевают определение, проводимое с теми же количествами реактивов и в тех же условиях, но без испытуемого образца.

Водяная баня. Если нет других указаний, то подразумевается баня с кипящей водой. Можно использовать и другие способы нагревания, если они гарантированно обеспечивают температуру, близкую, но не превосходящую 100°C (или другую указанную температуру).

Ледяная баня. Подразумевается баня с температурой 0°C. Если необходимо охлаждение до более низкой температуры, применяют смесь льда с некоторыми электролитами (соли, кислоты).

Высушивание и прокаливание до постоянной массы. Результаты двух последних взвешиваний должны отличаться не более чем на 0,5 мг; интервал времени между двумя взвешиваниями определяется свойствами и количеством высушиваемого/прокаливаемого остатка.

В тех случаях, когда требуется высушивание *«в эксикаторе»* или *«в вакууме»*, оно осуществляется в соответствии с условиями, описанными в статье *«Потеря в массе при высушивании»*.

РЕАКТИВЫ

Надежность результатов, получаемых с помощью описанных в Фармакопейных статьях аналитических операций, зависит, в частности, от качества используемых реактивов. Реактивы описаны в общей Фармакопейной статье *«Реактивы».* Подразумеваемая степень чистоты – не ниже квалификации «аналитической чистоты» (analytical grade) или квалификации «чистый для анализа» (ч.д.а.). Для некоторых реактивов включены испытания для определения пригодности.

РАСТВОРИТЕЛИ

Если для растворов не указан растворитель, то подразумевают водные растворы. Для проведения описанных в Фармакопейных статьях аналитических операций и для приготовления реактивов используют воду, соответствующую требованиям частной статьи *«Вода очищенная».* Термин «вода дистиллированная» означает «вода очищенная», полученная путем дистилляции.

Термин «этанол» без уточнений означает абсолютный спирт. Термин «спирт» без уточнений означает этиловый спирт, содержащий примерно 96 объемных процентов этанола. Другие степени разбавления обозначаются термином «спирт» с указанием содержания этанола в объемных процентах.

Термин «эфир» без уточнений означает диэтиловый эфир.

СПОСОБЫ ВЫРАЖЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ

Выражение «%» может иметь одно из трех значений:

- массовый процент (*м/м*) – число граммов вещества в 100 граммах конечного продукта;

- объемный процент (*об/об*) – число миллилитров вещества в 100 миллилитрах конечного продукта;

- # массо-объемный процент (*м/об*) – число граммов вещества в 100 миллилитрах конечного продукта.

Обозначение «ppm» (частей на миллион) подразумевает массовое соотношение.

Если указано, что при приготовлении смеси растворителей их берут в соотношении (a:b), то имеется в виду соотношение объемов. Например, соотношение: гексан-бензол (1:3) означает, что смешивают 1 объем гексана с 3 объемами бензола.

ТЕМПЕРАТУРА

Кроме конкретного указания температуры при проведении испытаний используют также следующие термины:

- глубокое охлаждение ниже -15°С;
- в холодильнике от 2°С до 8°С;
- в холодном или прохладном месте от 8°С до 15°С;
- при комнатной температуре от 15°С до 25°С.

Кроме терминов, приведенных выше, используются также следующие термины:

- теплый от 40°С до 50°С;
- горячий от 80°С до 90°С;
- температура «водяной бани» от 98°С до 100°С;

- температура «ледяной бани» 0°С.

1.3. ОБЩИЕ ФАРМАКОПЕЙНЫЕ СТАТЬИ

КОНТЕЙНЕРЫ

Материалы, используемые для контейнеров, описаны в общей статье 3. *«Контейнеры».*

Для материалов, используемых для производства контейнеров, особенно для полимерных материалов, используют общие названия, каждое из которых охватывает ряд материалов, отличающихся как свойствами основного компонента, так и используемыми добавками. Испытания и пределы нормирования зависят от конкретного состава материала и таким образом применимы только при условии, что материал соответствует вводной части его спецификации. По согласованию с компетентным уполномоченным органом могут использоваться материалы других составов, а также испытания для них.

Спецификации на контейнеры, включенные в статью 3, разрабатывались для всех контейнеров указанной категории. Однако, учитывая большое разнообразие существующих контейнеров и возможность появления новых контейнеров, публикация спецификации не исключает возможности использования контейнеров, соответствующих другой спецификации, если это обосновано и согласовано с компетентным уполномоченным органом.

В статьях Фармакопеи могут даваться ссылки на определения и спецификации контейнеров. В разделах «Определение», «Производство» общих статей на лекарственные формы может содержаться требование по использованию определенного типа контейнера. В разделе «Хранение» некоторых статей может указываться тип рекомендуемого контейнера.

1.4. ЧАСТНЫЕ ФАРМАКОПЕЙНЫЕ СТАТЬИ

НАЗВАНИЯ

Кроме названий на русском языке, приводится также латинское название. Это название может использоваться вместо русского названия, равно как и любой другой синоним, который признан эквивалентным компетентным уполномоченным органом.

ОТНОСИТЕЛЬНЫЕ АТОМНЫЕ И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАССЫ

Относительная атомная масса (А.м.) или относительная молекулярная масса (М.м.) указываются, когда это необходимо, в начале частной Фармакопейной статьи. Относительную атомную массу, относительную молекулярную массу, молекулярную формулу и графическую формулу приводят как информационный материал.

ВВОДНАЯ ЧАСТЬ ЧАСТНЫХ ФАРМАКОПЕЙНЫХ СТАТЕЙ

В вводной части, идущей после названия монографии, приводится официальное определение субстанции, готового лекарственного средства или иного продукта, являющегося предметом частной фармакопейной статьи.

Пределы содержания. Если указаны пределы содержания, то это пределы, полученные с использованием метода, указанного в разделе «Количественное определение».

Лекарственные средства, содержащие лекарственное растительное сырье. В частных статьях на лекарственные средства, содержащие лекарственное растительное сырье, вводная часть включает указание на предмет частной статьи. Это может быть, например, лекарственное растительное сырье в исходном виде или лекарственное растительное сырье, измельченное в порошок. Если частная статья распространяется на несколько вариантов, например, на оба из указанных, то это оговаривается во вводной части.

ПРОИЗВОДСТВО

Информация в разделе «Производство» призвана привлечь внимание к некоторым важным аспектам процесса производства и не обязательно является исчерпывающей. Содержащиеся в ней инструкции адресованы производителю. Они могут относиться, например, к материалам, к процессу производства, к его валидации и контролю, к постадийному контролю, а также к испытаниям, которые производитель должен проводить перед выпуском для каждой серии продукта или для выбранных серий. Эти положения обязательно должны быть подтверждены посредством анализа конечного продукта. Компетентным уполномоченным органом может быть установлено, что приведенные вышеуказанные аспекты были выполнены. Такое заключение может быть сделано на основании проверки полученных от производителя данных, или при инспектировании производства, или при испытании соответствующих образцов.

Отсутствие раздела «Производство» не означает, что аспекты процесса производства, отмеченные выше, не требуют внимания. Любой описанный в частной фармакопейной статье продукт должен производиться в соответствии с принципами надлежащей производственной практики (GMP) и соответствующими международными соглашениями, а также национальными и наднациональными законами, распространяющимися на продукты, предназначенные для использования в медицине.

В разделе «Производство» в частной фармакопейной статье на вакцину могут быть указаны свойства штамма и тестовые методы для подтверждения этих свойств. Эти методы приводятся для информации в качестве примера.

ОПИСАНИЕ (СВОЙСТВА)

Информация, приведенная в этом разделе, носит рекомендательный характер.

Растворимость. # Под «растворимостью» подразумевают свойство вещества растворяться в различных растворителях, принятых в ГФ РБ. Показатели растворимости вещества в различных растворителях приводятся в частных фармакопейных статьях.

Для обозначения растворимости в данном подразделе используются описательные термины, которые в температурном интервале от 15°С до 25°С имеют смысл, обозначенный в Табл. 1.4.-1.

Таблица 1.4.-1

Термин	**Примерное количество растворителя (мл), необходимое для растворения 1 г вещества**	
Очень легко растворим	до 1	
Легко растворим	от 1	до 10
Растворим	от 10	до 30
Умеренно растворим	от 30	до 100
Мало растворим	от 100	до 1000
Очень мало растворим	от 1000	до 10000
Практически нерастворим	более 10000	
Частично растворим	Термин используется для характеристики смесей, содержащих как растворимые, так и нерастворимые компоненты	
Смешивается с…	Термин используется для характеристики жидкостей, смешивающихся с указанным растворителем во всех соотношениях	

Примечание: Для определения растворимости навеску вещества вносят в отмеренное количество растворителя и непрерывно встряхивают в течение 10 минут при температуре 20±5°С. Предварительно образец может быть растерт. Для медленно растворимых образцов, требующих для своего растворения более 10 минут, допускается также нагревание на водяной бане до 30°С; наблюдение производят после охлаждения раствора до температуры 20±5°С и энергичного встряхивания в течение 1-2 минут. Вещество считают растворившимся, если в растворе при наблюдении в проходящем свете не обнаруживаются частицы вещества. Для веществ, образующих при растворении мутные растворы, соответствующее указание должно быть приведено в частной фармакопейной статье. Если указано, что субстанция растворима в жирных маслах, то имеется в виду, что она растворима в любом масле, относящемуся к классу жирных масел.

ПОДЛИННОСТЬ (ИДЕНТИФИКАЦИЯ)

Приводимые в этом разделе испытания не рассчитаны на полное подтверждение химической структуры или состава продукта. Они предназначены для подтверждения с приемлемой степенью достоверности того, что продукт соответствует информации, приведенной на этикетке.

В некоторых частных фармакопейных статьях имеются подразделы «Первая идентификация» и «Вторая идентификация». Обычно используют первую идентификацию. Если имеется гарантия того, что данная серия субстанции была ранее сертифицирована на соответствие всем требованиям частной фармакопейной статьи, испытания из второго подраздела могут использоваться вместо испытаний из первого подраздела.

ИСПЫТАНИЯ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Область применения. Эти требования не рассчитаны на охват всех возможных примесей. В частности, если примесь не определяется с помощью описанных испытаний, а здравый смысл и надлежащая производственная практика не допускает ее присутствия, не следует делать вывод, что она допустима. См. также ниже раздел «Примеси».

Если в испытаниях с использованием хроматографических методов после указания вводимого или наносимого объема раствора в микролитрах в скобках указывается количество вещества в микрограммах, то имеется в виду приблизительное количество.

Если указано, что испытание проводят «в защищенном от света месте», то это означает, что следует принять меры для избежания попадания прямого солнечного света, любого другого яркого света, а также исключить попадание ультрафиолетового света, например, путем использования посуды из специального стекла, работы в затемненной комнате и т.д.

Расчеты. Если при проведении вычислений требуется выполнить пересчет на сухое вещество или безводное вещество или оговорено какое-либо другое условие, то потерю в массе при высушивании, содержание воды или иной показатель определяют с помощью метода, описанного в частной фармакопейной статье. Слова «сухое вещество» или «безводное вещество» и другие указываются в скобках после результата.

Пределы. Указываемые пределы основываются на результатах, полученных в рамках обычной аналитической практики; в них уже учтены обычные аналитические погрешности, допустимый разброс при производстве и приготовлении, а также ухудшение качества в процессе хранения в пределах, которые считаются приемлемыми. При определении соответствия продукта требованиям частной фармакопейной статьи к указанным пределам не должны добавляться никакие дополнительные допуски.

Результат, полученный в испытании, округляют до указанного в пределе количества значащих цифр (если нет других указаний). При этом последнюю цифру увеличивают на единицу, если цифра, отбрасываемая при округлении, больше или равна пяти. Если цифра, отбрасываемая при округлении, меньше пяти, последнюю цифру оставляют неизменной.

Определение и допустимый предел примесей. Примерное допустимое содержание примеси или суммы примесей может быть указано в скобках только для информации. Если для данной примеси не указано использование стандартного образца, ее содержание может быть выражено исходя из номинальной концентрации вещества, используемого для приготовления указанного в частной Фармакопейной статье раствора сравнения (если нет других указаний).

Лекарственные средства, содержащие лекарственное растительное сырье. Для лекарственного средства, содержащего лекарственное растительное сырье, сульфатная зола, общая зола, растворимые в воде посторонние вещества, растворимые в спирте посторонние вещества, содержание воды, содержание эфирных масел и содержание действующих веществ вычисляют в расчете на лекарственное средство, которое не было специально высушено (если нет других указаний в частной фармакопейной статье).

Эквиваленты (титры). В тех случаях, когда приводится эквивалент, он дается с таким количеством значащих цифр, которое требуется в данной монографии.

ХРАНЕНИЕ

Информация и рекомендации, приводимые в разделе «Хранение», не являются исчерпывающими фармакопейными требованиями, и компетентные уполномоченные органы могут указывать конкретные условия хранения, обязательные для исполнения.

Описанные в Фармакопее продукты следует хранить таким образом, чтобы предотвратить их загрязнение и, по возможности, разложение. Если рекомендуются особые условия хранения, включая тип контейнера (см. выше раздел «Контейнеры») и температурные пределы, эти рекомендации приводятся в монографии.

Ниже разъясняются термины, используемые в частных фармакопейных статьях в разделе «Хранение».

«Температура». Продукт должен храниться в соответствии с требованиями, указанными в Табл. 1.4.-2.

Таблица 1.4.-2.:

Условия хранения лекарственного средства	**Температурные пределы, указываемые на упаковке**	**Дополнительное указание (при необходимости)**
Лекарственное средство не требует особых условий хранения	Нет	«Не охлаждать» или «Не замораживать»
Лекарственное средство требует условий хранения при температуре не выше 30^{o}C (температура хранения от +2^{o}C до +30^{o}C)	«Хранить при температуре не выше 30^{o}C» или «Хранить при температуре ниже 30^{o}C»	«Не охлаждать» или «Не замораживать»
Лекарственное средство требует условий хранения при температуре не выше 25^{o}C (температура хранения от +2^{o}C до +25^{o}C)	«Хранить при температуре не выше 25^{o}C» или «Хранить при температуре ниже 25^{o}C»	«Не охлаждать» или «Не замораживать»
Лекарственное средство требует хранения при комнатной температуре	«Хранить при температуре от 15^{o}C до 25^{o}C»	«Не охлаждать» или «Не замораживать»
Лекарственное средство требует хранения в холодном или прохладном месте	Хранить при температуре от 8^{o}C до 15^{o}C	«Не замораживать»
Лекарственное средство требует	«Хранить при температуре от 2^{o}C до	«Не замораживать»

хранения в холодильнике	8°С»	
Лекарственное средство требует хранения при температуре ниже 0°С	«Хранить в морозильной камере» или «Хранить и транспортировать в морозильной камере»	

Примечаня:

- под термином «Не охлаждать» подразумевается температура от 2°С до 8°С;
- допускается кратковременное изменение условий хранения в процессе местной транспортировки для лекарственных средств, не имеющих дополнительное указание по хранению «Не охлаждать» или «Не замораживать».

«Защищать от влаги». Это означает, что относительная влажность в условиях хранения должна быть не выше 60%. Продукт должен храниться в воздухонепроницаемом контейнере. При вскрытии контейнера во влажной атмосфере необходимо проявлять осторожность. При необходимости низкое содержание влаги можно поддерживать с помощью осушающих веществ, при условии, что их прямой контакт с продуктом будет исключен.

«В защищенном от света месте». Продукт должен храниться в контейнере, изготовленном из материала, в достаточной степени поглощающего свет, способный вызвать фотохимические превращения; или контейнер должен быть помещен во внешний контейнер, обеспечивающий такую защиту; или лекарственное средство (вещество) должно храниться в месте, исключающем возможность попадания такого света.

МАРКИРОВКА

Маркировка регламентируется компетентным уполномоченным органом с изданием соответствующего нормативного правового акта. Таким образом, информация в разделе «Маркировка» не претендует на полноту. Она ориентирована прежде всего на фармакопейные цели, и обязательными являются только те положения, которые необходимы для подтверждения соответствия продукта статье. Вся остальная информация носит рекомендательный характер. В тех случаях, когда в Фармакопее употребляется термин «этикетка», соответствующая информация может быть помещена на контейнере, на упаковке или во вкладыше, в зависимости от решения компетентного уполномоченного органа.

ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЯ

Описываемые в Фармакопее продукты и реактивы могут оказаться опасными для здоровья, если не предпринять необходимые меры. Во всех случаях следует придерживаться принципов надлежащей лабораторной практики (НЛП, GLP), а также соответствующих положений техники безопасности. В некоторые статьи включены специальные указания о необходимых мерах предосторожности. Но отсутствие таких указаний не следует трактовать как отсутствие всякого риска.

ПРИМЕСИ

В частной фармакопейной статье может быть приведен перечень всех известных и потенциальных примесей, для которых показано, что они контролируются испытаниями. Этот список содержит названия примесей и их структурные формулы; он предназначен только для информации. Перечень можно разделить на «Охарактеризованные примеси» (т.е. те, которые ранее были признаны компетентными органами в качестве охарактеризованных; туда могут также быть включены и примеси, которые считаются охарактеризованными другими способами, например примеси, которые встречаются в виде естественных метаболитов) и «Другие определяемые примеси» (например, потенциальные примеси, которые не были определены в каких-либо образцах субстанции во время разработки монографии или которые встречаются в концентрациях менее 0,1%, но содержание которых может ограничиваться с помощью тестов, описываемых в частной фармакопейной статье).

ФИЗИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

В Фармакопейных статьях может также приводиться в качестве информации и рекомендаций перечень физических характеристик, которые не относятся к официальным требованиям, но тем не менее важны при использовании продукта (см. выше «Общие положения» 1.1.).

СТАНДАРТНЫЕ ОБРАЗЦЫ, СТАНДАРТНЫЕ ПРЕПАРАТЫ И ЭТАЛОННЫЕ СПЕКТРЫ

Некоторые общие и частные фармакопейные статьи предусматривают использование стандартных образцов, стандартных препаратов и эталонных спектров. Они разработаны с учетом их предназначения, и их следует использовать так, как предписывает Фармакопея. В других обстоятельствах они могут оказаться непригодными.

Стандартные образцы, стандартные препараты и эталонные спектры вводятся в действие уполномоченным компетентным органом. Полный перечень может быть получен в указанной организации. Эти стандартные материалы являются официальными в случае арбитража.

Рабочие стандартные образцы могут использоваться для проведения текущих анализов при условии, что они откалиброваны по Фармакопейным стандартным образцам (ФСО). # Фармакопейные стандартные образцы – стандартные образцы, введенные в действие уполномоченным компетентным органом Республики Беларусь.

Вся информация, необходимая для правильного использования стандартного образца или стандартного препарата, приводится на упаковке, во вкладыше или в соответствующей документации. Если не указаны условия высушивания, стандарт следует использовать в таком виде, в котором он получен. Ни сертификат анализа, ни какая-либо иная дополнительная информация не предоставляется. Не указывается также дата «Годен до…»: гарантируется стабильность стандартного образца или стандартного препарата в момент отправки и возможность его использования в течение шести месяцев при условии, что не вскрытый контейнер хранится в условиях, указанных в сопроводительной документации. По истечении этого срока следует проконсультироваться в уполномоченном компетентном органе. Стабильность содержимого вскрытого контейнера не гарантируется.

Химические стандартные образцы. Аббревиатура ФСО означает химические стандартные образцы, введенные уполномоченным компетентным

органом Республики Беларусь. Некоторые химические стандартные вещества используются для микробиологического количественного определения антибиотиков. В этом случае их активность выражается в Международных Единицах (МЕ), таким же образом, как для биологических стандартных препаратов, и указывается на упаковке или в сопроводительном документе.

Биологические стандартные препараты. Большинство упомянутых в Фармакопейных статьях биологических стандартных препаратов – это соответствующие Международные стандарты и стандартные препараты, установленные Всемирной Организацией Здравоохранения (ВОЗ). Поскольку они, как правило, доступны в ограниченных количествах, установлены свои биологические стандартные препараты (БСП). Их активность выражена, когда это возможно, в МЕ. Для некоторых биологических стандартных препаратов, для которых не существует внутренних стандартов или препаратов сравнения, активность выражается в Европейских Фармакопейных единицах (ЕФЕ).

Эталонные спектры. Эталонный спектр сопровождается информацией об условиях приготовления испытуемого образца и записи спектра. Эталонные спектры введятся в действие уполномоченным компетентным органом Республики Беларусь. Некоторые

1.5. СОКРАЩЕНИЯ И ОБОЗНАЧЕНИЯ

СИМВОЛЫ

A	Оптическая плотность
$A_{1см}^{1\%}$	Удельный показатель поглощения
А.м.	Относительная атомная масса
$[\alpha]_D^{20}$	Удельное оптическое вращение
БСП	Биологический стандартный препарат
ФСО	Фармакопейный стандартный образец
d_{20}^{20}	Относительная плотность
МЕ	Международные Единицы
λ	Длина волны
M	Молярность
М.м.	Относительная молекулярная масса
n_D^{20}	Показатель преломления
ЕФЕ	Европейская фармакопейная единица
ppm	Одна часть на миллион частей
Р	Вещество или раствор, указанный в статье *«Реактивы»*
R_f	Используется в ТСХ для обозначения отношения пути, пройденного веществом, к пути, пройденному фронтом растворителя
R_{St}	Используется в ТСХ для обозначения пути, пройденного испытуемым веществом, к пути, пройденному стандартным веществом
РО	Исходные стандартные вещества для установки титра титрованных растворов в объемном анализе

АББРЕВИАТУРЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ЧАСТНЫХ ФАРМАКОПЕЙНЫХ СТАТЬЯХ НА ИММУНОГЛОБУЛИНЫ, СЫВОРТКИ И ВАКЦИНЫ

LD_{50}	Медианная летальная доза. Статистически определенное количество вещества, которое, при соответствующем применении, может вызвать смерть 50% испытуемых животных за исследуемый период.
MLD	Минимальная летальная доза
L+/10 dose	Наименьшее количество токсина, которое в смеси с 0,1 МЕ антитоксина и обычном пути введения способно вызвать гибель лабораторных животных в экспериментальных условиях за исследуемый период.
L+ dose	Наименьшее количество токсина, которое в смеси с 1 МЕ антитоксина и обычном пути введения способно вызвать гибель лабораторных животных в экспериментальных условиях за исследуемый период.
1r/100 dose	Наименьшее количество токсина, которое в смеси с 0,01 МЕ антитоксина при внутрикожном введении способно вызвать характерные реакции в месте введения у лабораторных животных в экспериментальных условиях за исследуемый период.
Lp/10 dose	Наименьшее количество токсина, которое в смеси с 0,1 МЕ антитоксина при внутрикожном введении способно вызвать характерные реакции в месте введения у лабораторных животных в экспериментальных условиях за исследуемый период.
Lo/10 dose	Наименьшее количество токсина, которое в смеси с 0,1 МЕ антитоксина и обычном пути введения не способно вызвать токсической реакции у лабораторных животных в экспериментальных условиях за исследуемый период.
Lf dose	Количество токсина или токсиноподобного вещества, которое способно связать 1 МЕ антитоксина за кратчайшее время.
$CCID_{50}$	Медианная инфицирующая доза культуры клеток. Статистически определенная доза вирусных частиц, которая, при внесении в клеточную культуру способна инфицировать 50% клеток.
EID_{50}	Медианная инфицирующая доза яиц. Статистически определенная доза вирусных частиц, которая, при внесении в оплодотворенные яйца способна инфицировать 50% эмбрионов.
ID_{50}	Медианная инфицирующая доза. Статистически определенная доза вирусных частиц, которая, при введении в организм животных способна инфицировать 50% особей.
PD_{50}	Медианная защитная доза. Статистически определенная доза вакцины, которая в экспериментальных условиях способна защитить 50% животных от инфицирующей дозы микроорганизмов или токсинов, в отношении которых эта вакцина активна.
ED_{50}	Статистически определенная доза вакцины, которая в

	экспериментальных условиях способна индуцировать выработку антител к соответствующим антигенам вакцины у 50% животных.
PFU	Оспино-образующие единицы или бляшкообразующее число.
SPF	Свободный от видовых патогенов.

КОЛЛЕКЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ

ATCC	Американская коллекция типовых культур American Type Culture Collection 12301 Parklawn Drive Rockville, MD 20852, USA
C.I.P.	Коллекция Пастеровского института (штаммы бактерий) Collection de l′ InstititutePasteur (strains of bacteria)
IMI	International Mycological Institute Bakeham Lane Международный институт микологии
I.P.	Пастеровский институт (штаммы других микроорганизмов) Instititute Pasteur (strains of other microorganisms) Service de la Collection Nationale de Culture de Microorganismes (C.N.C.M.) 25, rue du Docteur-Roux F-75015 Paris, France
NCIMB	Национальная коллекция промышленных и морских бактерий National Collection of Industrial and Marine Bacteria Ltd 23 St Machar Drive Aberdeen AB2 1 DY, Great Britain
NCPF	Национальная коллекция патогенных грибов National Collection of Pathogenig Fungi London School of Hygiene and Tropical Medicine Keppel Street London WC1E 7HT, Great Britain
NCTC	Национальная коллекция типовых культур National Collection of Type Cultures Central Public Health Laboratory Colindale Avenue London NW9 5HT, Great Britain
NCYC	Национальная коллекция дрожжевых культур National Collection of Yeast Cultures AFCR Food Research Institute Colney Lane Norwich NR4 7UA, Great Britain
S.S.I.	Государственный институт сывороток Statens Serum Institut 80 Amager Boulevard, Copenhagen, Denmark

Украинская коллекция микроорганизмов
Институт микробиологии им. Д.К.Заболотного НАН Украины
01000, Киев, ул. Заболотного, 154

Коллекция штаммов Российского музея патогенных бактерий
Государственный институт стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А.Тарасевича
121002, Москва, Сивцев-Вражек, 41

Белорусская коллекция непатогенных микроорганизмов (научная коллекция непатогенных типовых и промышленно-ценных микроорганизмов института микробиологии НАН Беларуси)
ГНУ "Институт микробиологии" НАН Беларуси
220141, Минск, ул. Купревича, 2

1.6. ЕДИНИЦЫ МЕЖДУНАРОДНОЙ СИСТЕМЫ (СИ), ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ФАРМАКОПЕЙНЫХ СТАТЬЯХ, И ИХ СООТВЕТСТВИЕ ДРУГИМ ЕДИНИЦАМ

МЕЖДУНАРОДНАЯ СИСТЕМА ЕДИНИЦ (СИ)

Международная система единиц состоит из трех классов единиц физических величин, а именно: основные единицы, производные единицы и вспомогательные единицы. Основные единицы и их определения приведены в Табл. 1.6.-1.

Таблица 1.6.-1.

Основные единицы СИ

Величина		Единица		Определение
Наименование	Символ	Наименование	Символ	
Длина	*l*	метр	м	Один метр представляет собой длину пути, который проходит свет в вакууме за 1/299 792 458 долю секунды
Масса	*m*	килограмм	кг	Один килограмм равен массе международного прототипа килограмма
Время	*t*	секунда	с	Одна секунда представляет собой продолжительность 9 192 631 770 периодов излучения, соответствующих переходу между двумя сверхтонкими уровнями основного состояния атома цезия - 133
Сила тока	*I*	ампер	А	Один ампер представляет собой силу неизменяющегося тока, который при прохождении по двум прямолинейным параллельным проводникам бесконечной длины и пренебрежимо малой площади кругового поперечного сечения, расположенным на расстоянии 1 метр один от другого в вакууме, вызывал бы силу взаимодействия, равную $2 \cdot 10^{-7}$ ньютона на один метр длины

Термодинамическая (абсолютная) температура	*T*	кельвин	К	Один кельвин представляет собой 1/273,16 часть термодинамической температуры тройной точки воды
Количество вещества	*n*	моль	М	Один моль представляет собой количество вещества системы, содержащей столько же структурных элементов, сколько атомов содержится в 0,012 килограммах углерода-12(*)
Сила света	I_v	кандела	кд	Кандела представляет собой силу света источника, испускающего в данном направлении монохроматическое излучение частотой $540 \cdot 10^{12}$ герц, энергетическая сила которого в этом направлении составляет 1/683 ватта на один стерадиан

(*) Если использованы моли, то следует указывать, к чему они относятся, например, атомы, молекулы, ионы, электроны, иные частицы или определенные группы таких объектов.

Единицы физических величин, входящие в систему, но определяемые через основные единицы этой системы, называются производными единицами системы. Некоторые из таких производных величин имеют свои названия и символы. Единицы таких величин, используемых в Фармакопейных статьях, приведены в Табл. 1.6.-2.

Таблица 1.6.-2.

Единицы СИ Европейской Фармакопеи и их соответствие другим единицам

Величина		**Единица**				**Преобразование иных единиц в единицы СИ**
Наименование	**Символ**	**Наименование**	**Символ**	**Выражение в основных единицах СИ**	**Выражение в иных единицах СИ**	
Волновое число	ν	единица на один метр	1/м	$м^{-1}$		
Длина волны	λ	микрометр	мкм	10^{-6}м		
		нанометр	нм	10^{-9}м		
Площадь	A,S	квадратный метр	$м^2$	$м^2$		
Объем	*V*	кубический метр	$м^3$	$м^3$		1 мл = 1 $см^3$ = 10^{-6} $м^3$
Частота	*ν*	герц	Гц	$с^{-1}$		
Плотность	*ρ*	килограмм на метр кубический	кг/ $м^3$	$кг \cdot м^{-3}$		1 г/мл = 1г/$см^3$ = $10^3 \cdot кг \cdot м^{-3}$
Скорость	*v*	метр в секунду	м/с	$м.с^{-1}$		
Сила	*F*	ньютон	Н	$м \cdot кг \cdot с^{-2}$		1 дин = $1г \cdot см \cdot с^{-2}$ = 10^{-5} Н 1 kp = 9,806 65 Н
Давление	*p*	паскаль	Па	$м^{-1} \cdot кг \cdot с^{-2}$	$Н \cdot м^{-2}$	1 дин/$см^2$ = 10^{-1}Па = 10^{-1} $Н \cdot м^{-2}$ 1 атм = 101325Па = 101,325 кПа 1 бар = 10^5Па = 0,1МПа 1 мм рт.ст. = 133,322387Па 1 Торр = 133,322368Па 1 psi = 6,894757кПа
Динамическая вязкость	*η*	паскаль-секунда	$Па \cdot с$	$м^{-1} \cdot кг \cdot с^{-1}$	$Н \cdot с \cdot м^{-2}$	1 П = $10^{-1}$$Па \cdot с$ = $10^{-1}$$Н \cdot с \cdot м^{-2}$ 1 сП = $1мПа \cdot с$
Кинетическая вязкость	*ν*	квадратный метр на секунду	$м^2$/с	$м^2 \cdot с^{-1}$	$Па \cdot с \cdot м^3 \cdot кг^{--1}$ $Н \cdot м \cdot с \cdot кг^{--1}$	1 Ст = 1 $см^2 \cdot с^{-1}$ = $10^{-4} \cdot м^2 \cdot с^{-1}$

Энергия	*W*	джоуль	Дж	$м^2 \cdot кг \cdot с^{-2}$	$Н \cdot м$	1 эрг = $1 см^2 \cdot г \cdot с^{-2}$ = 1 $дин \cdot см$ = 10^{-1} Дж 1 кал = 4,1868 Дж
Поток электромагнитного излучения	*P*	ватт	Вт	$м^2 \cdot кг \cdot с^{-3}$	$Н \cdot м \cdot с^{-1}$ $Дж \cdot с$	1 эрг/с = 1 $дин \cdot см \cdot с^{-1}$ = 10^{-7} Вт = 10^{-7} $Н \cdot м \cdot с^{-1}$ = 10^{-7} $Дж \cdot с^{-1}$
Поглощенная доза ионизирующего излучения	*D*	грэй	Гр	$м^2 \cdot с^{-2}$	$Дж \cdot кг^{-1}$	1 рад = 10^{-2} Гр
Электрический потенциал, электродвижущая сила	*U*	вольт	В	$м^2 \cdot кг \cdot с^{-3} \cdot А^{-1}$	$Вт \cdot А^{-1}$	
Электрическое сопротивление	*R*	ом	Ом	$м^2 \cdot кг \cdot с^{-3} \cdot А^{-2}$	$В \cdot А^{-1}$	
Количество электричества	Q	кулон	Кл	$А \cdot с$		
Радиоактивность вещества	*A*	беккерель	Бк	$с^{-1}$		1 Ku = $37 \cdot 10^9$ Бк = $37 \cdot 10^9$ $с^{-1}$
Молярная концентрация	*c*	моль на кубический метр	моль/$м^3$	$моль \cdot м^{-3}$		1 моль/л = 1М = 1 моль/$дм^3$ = 10^3 $моль \cdot м^{-3}$
Массовая концентрация	*ρ*	килограмм на кубический метр	кг/$м^3$	$кг \cdot м^{-3}$		1 г/л = 1 г/$дм^3$ = 1 $кг \cdot м^{-3}$

Некоторые важные и широко используемые единицы, не входящие в СИ, приведены в Табл. 1.6.-3.

Таблица 1.6.-3.

Единицы, используемые наряду с Международной системой единиц

Величина	**Единица**		**Значение в единицах СИ**
	название	**символ**	
Время	минута	мин	1 мин = 60 с
	час	ч	1 ч = 60 мин = 3600 с
	сутки	сутки	1 сут = 24 ч = 86 400 с
Угол на плоскости	градус	^{o}	1 = (π/180) рад
Объем	литр	л	1 л = 1 $дм^3$ = 10^{-3} $м^3$
Масса	тонна	т	1 т = 10^3 кг
Частота вращения	оборот в минуту	об/мин	1 об/мин = (1/60) $с^{-1}$

Множительные приставки для образования десятичных дольных и кратных единиц приведены в Табл. 1.6.- 4.

Таблица 1.6.-4.

Множители и приставки для образования десятичных кратных и дольных единиц

Множитель	**Приставка**	**Обозначение**	**Множитель**	**Приставка**	**Обозначение**
10^{18}	экза	Е	10^{-1}	деци	д
10^{15}	пета	Р	10^{-2}	санти	с
10^{12}	тера	Т	10^{-3}	милли	м
10^9	гига	Г	10^{-6}	микро	мк
10^6	мега	М	10^{-9}	нано	н
10^3	кило	К	10^{-12}	пико	п
10^2	гекто	Г	10^{-15}	фемто	Ф
10^1	дека	да	10^{-18}	атто	а

ПРИМЕЧАНИЯ

1. Для обозначения температуры по Цельсию используется символ *t*. Температура по Цельсию определяется согласно уравнению $t = T-T_o$, где T_o=273,15 К. Температура по Цельсию выражается в градусах Цельсия (символ ^oC). Один «градус Цельсия» равен одному кельвину.

2. Практические выражения для концентраций определены в Общих замечаниях.

3. Радиан представляет собой плоский угол, вырезающий на окружности дугу, равную по длине радиусу.

4. Условия центрифугирования определяются центробежным ускорением по отношению к ускорению свободного падения (g), которое принимается равным g = 9,806 65 $м \cdot с^{-2}$.

5. Некоторые величины используются без размерности, как, например, относительная плотность (статья «Относительная плотность» 2.2.5.), оптическая плотность (статья «Абсорбционная спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях» 2.2.25.), удельный показатель поглощения (статья «Абсорбционная спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях» 2.2.25.) и показатель преломления (статья «Показатель преломления» 2.2.6.); равно как и величины, выраженные в иных единицах, как, например, удельный показатель оптического вращения (статья «Оптическое вращение» 2.2.7.).

6. Микрокатал определяется как энзиматическая активность, которая при указанных условиях приводит к превращению (например, к гидролизу) 1 микромоля субстрата за одну секунду.

1.7. ОТБОР ПРОБ

ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ

Выборка - количество штучной продукции, отобранной из контролируемой серии (партии).

Готовый продукт - продукт, прошедший все стадии техологического процесса, включая маркировку, упаковку, лабораторный контроль.

Контейнер - изделие, которое содержит продукцию или предназначено для ее хранения и находится или может находиться в непосредственном контакте с ней. Укупорочное средство является частью контейнера.

Контроль - процедура оценки соответствия путем измерений, наблюдений, испытаний или калибрования соответствующих характеристик.

Контаминация - процесс загрязнения

Нерасфасованный продукт (ангро или in bulk product) - продукт, прошедший все стадии технологического процесса, кроме упаковывания.

Отбор проб - действия по изъятию проб сырья, материалов, полупродуктов, промежуточной и готовой продукции для исследования их качества.

Объем выборки - число выборочных единиц в выборке.

Объединенная проба - проба продукции, состоящая из нескольких точечных проб, отобранных из контролируемой партии.

Образец продукции - единица конкретной продукции, используемая в качестве представителя этой продукции при исследовании, контроле и оценке.

Промежуточная продукция - частично обработанное сырье или продукция, которые должны пройти последующие технологические операции прежде, чем стать нерасфасованной продукцией.

Проба - количество нештучной продукции, отобранной из контролируемой серии (партии) для принятия решения и состоящая из нескольких точечных проб.

Сырье - фармацевтические субстанции, части лекарственных растений или продукты их переработки, вспомогательные вещества, собственного производства или получаемые от внешних поставщиков, используемые в производстве лекарственных средств, за исключением маркировочных и упаковочных материалов.

Серия (партия) - количество продукции одного наименования, полученное в одном технологическом цикле или в течение определенного интервала времени, в одних и тех же условиях и одновременно представленной на контроль. Качество серии (партии) должно быть удостоверено одним документом.

Точечная проба - количество продукции, взятое за один раз из одного места серии (партии) одномоментно.

Упаковка - средство или комплект средств, обеспечивающее: защиту продукции от повреждений и потерь, окружающую среду от загрязнения, а также процесс обращения продукции.

Упаковочная единица - упаковка, содержащая установленное количество продукции.

Чистая зона - зона, в которой контролируется окружающая среда на наличие контаминирующих частиц и микроорганизмов, построенная и эксплуатируемая таким образом, чтобы уменьшить проникновение, образование контаминантов внутри зоны.

ОБЩИЕ ПРАВИЛА

Отбор проб для испытаний должен проводиться в соответствии с процедурой отбора если не указано иное в частных статьях.

Процедура отбора проб включает:

- план или схему отбора проб;
- место и время отбора проб;
- извлечение и подготовку проб продукции для испытаний;
- объем и тип отбора проб;
- параметры окружающей среды при отборе и подготовке проб для испытаний.

Все оборудование, используемое для отбора проб, включая измерительное оборудование для проведения испытаний, связанных с отбором проб, должно удовлетворять требованиям нормативной документации или процедуре отбора проб и должно работать в соответствии с данной процедурой или инструкциями (эксплутационной документацией) на оборудование. Измерительное оборудование должно пройти в установленном порядке поверку или аттестацию.

Персонал, выполняющий отбор проб, должен владеть процедурой отбора. Документация по процедуре отбора проб должна находиться в местах отбора отбора проб и быть доступной для персонала.

В процессе проведения отбора проб необходимо учитывать факторы, которые должны контролироваться с тем, чтобы обеспечить достоверность результатов испытаний. К ним относятся: показатели, обеспечивающие соответствие контролируемых показателей качества и безопасности проб показателям объекта испытаний и стабильность этих показателей в течение периода проведения испытаний; параметры окружающей среды и других воздействующих на пробы факторов.

Пробы прошедшие отбор должны соответствующим образом идентифицироваться с использованием единой маркировки и оформляться актом отбора или другим документом, включающим дату, время и место отбора, условия

окружающей среды при отборе, фамилию, имя и отчество лица, проводившего отбор и другую необходимую информацию.

Если поставка сырья или готовой продукции состоит из нескольких серий (партий), то каждую серию (партию) необходимо рассматривать как отдельную в отношении отбора проб и проведения испытаний.

Не допускается отбор проб одновременно от двух и более наименований, двух и более серий (партий) сырья или готовой продукии во избежании ошибок при отборе проб.

Отбор проб для нерасфасованной продукции (ангро или bulk product) должен осуществляться в стерильные контейнеры. Упаковка должна обеспечивать пригодность пробы для проведения испытаний.

К отбору от следующей серии (партии) поступившего сырья или готовой продукции можно приступать только после выполнения всей процедуры отбора от предыдущей серии (партии).

Отбор проб следует производить только из неповрежденных, укупоренных и упакованных согласно нормативной документации упаковочных единиц.

До и после проведения испытаний пробы должны храниться в отдельном помещении. Условия в помещении должны обеспечивать сохранность проб в течение срока хранения.

Перед отбором проб необходимо произвести внешний осмотр упаковочной тары (ящики, короба, барабаны, бутыли и т.д.), определить ее количество, целостность, наличие пломб, правильность маркировки и оформление сопроводительной документации, а также соответствие тары и упаковки требованиям спецификации.

Количество упаковочных единиц, отобранных для отбора, рассчитывают по формуле:

$$0{,}4\sqrt{n}\ ,$$

где:

n – общее количество упаковочных единиц одной серии (партии).

Количество вскрытых упаковочных единиц должно быть не менее 3 и не более 30.

Отбор проб сырья необходимо производить в отдельном помещении или в складском помещении таким образом, чтобы предотвратить контаминацию.

Для проведения испытаний лекарственных средств на соответствие требованиям нормативной документации проводят многоступенчатый отбор проб. При многоступенчатом отборе пробу образуют по ступеням и продукцию в каждой ступени отбирают случайным образом в пропорциональных количествах из единиц, отобранных в предыдущей ступени. Число ступеней определяется видом упаковки.

I ступень: отбор единиц упаковочной тары (ящиков, коробок, мешков и др.)

II ступень: отбор упаковочных единиц, находящихся в упаковочной таре (пакетов, флаконов,банок, бутылок, рулонов и др.)

III ступень: отбор продукции в первичной упаковке (ампул, флаконов, туб, контурных упаковок и др.)

При отборе проб необходимо принимать меры предосторожности и требования безопасности, учитывая токсичность, взрывчатость, огнеопасность, гигроскопичность и другие свойства сырья, а также меры, направленные на предохранение проб (образцов) от повреждения и загрязнения во время работы с ними, к их упаковке, транспортировке, складированию и хранению с учетом требований и методов последующих испытаний.

При отборе проб лекарственных средств списка «А», наркотических и психотропных лекарственных средств следует руководствоваться правилами, инструкциями и положениями, утвержденными Министерством здравоохранения Республики Беларусь и частными статьями на эти лекарственные средства.

При отборе проб запрещается принимать пищу, пить, курить, а также хранить еду, средства для курения в специальной одежде или месте отбора проб.

Персонал, занятый отбором проб, должен строго соблюдать инструкции, регламентирующие состояние здоровья и требования личной гигиены, носить специальную обувь.

ОТБОР ПРОБ ИЗ НЕРАСФАСОВАННОЙ ПРОДУКЦИИ (АНГРО ИЛИ IN BULK PRODUCT)

Проба из нерасфасованной продукции должна представлять собой объединенные точечные пробы, взятые примерно в равных количествах.

Отбор точечных проб (объединенная проба) необходимо производить из верхнего, среднего и нижнего слоев каждой упаковочной единицы, убедиться в однородности сыпучих, вязких и гетерогенных препаратов.

При отборе проб сыпучих и вязких лекарственных средств и вспомогательных веществ, для предотвращения перекрестной контаминации точечные пробы необходимо отбирать чистыми и стерильными пробоотборниками, изготовленным из материала, не реагирующего с данным сырьем. Детали пробоотборников, контактирующие с сырьем, должны быть обработаны специальными антисептиками, разрешенными к применению Министерством здравоохранения Республики Беларусь

В случае, если перемешивание жидкости затруднено (большие емкости), точечные пробы отбирают без перемешивания из разных слоев.

ОТБОР ПРОБ ГОТОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ (ГОТОВОЙ ПРОДУКЦИИ)

Отбор проб готовых лекарственных средств должен производиться из ненарушенных заводских упаковочных единиц.

Отбор проб готовых лекарственных средств для инъекций и глазных лекарственных средств на отсутствие в них механических включений должен производиться согласно соответствующей документации, утвержденной Министерством здравоохранения Республики Беларусь.

Отбор проб аэрозолей проводят в соответствии с требованиями частных статей.

2. МЕТОДЫ АНАЛИЗА

2.1. ОБОРУДОВАНИЕ

2.1.1. КАПЛЕМЕР

Термин «капли» обозначает стандартные капли, вытекающие из стандартного каплемера, как описано ниже.

Стандартные каплемеры (Рис. 2.1.1.-1) изготавливают из бесцветного стекла. Нижний конец имеет круглое отверстие, расположенное в плоскости перпендикулярной оси.

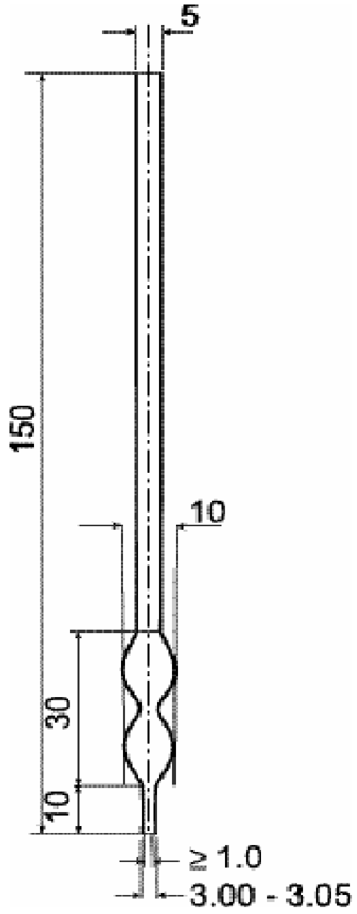


Рисунок 2.1.1.-1 Стандартный каплемер
Размеры приведены в миллиметрах

Другие каплемеры (пипетки) могут быть использованы, если они отвечают требованиям следующего теста.

Двадцать капель *воды Р* при температуре 20±1°С, свободно истекающих из каплемера (пипетки), удерживаемого в вертикальном положении, со скоростью одна капля в секунду, должны иметь массу 1000±50 мг.

Каплемер (пипетка) перед использованием должен быть тщательно вымыт. Проводят три определения для каждого каплемера (пипетки). Ни один из результатов не должен отклоняться более чем на 5% от среднего значения трех определений.

2.1.2. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ТАБЛИЦА ПОРИСТОСТИ СТЕКЛЯННЫХ ФИЛЬТРОВ

Таблица 2.1.2.-1.

Пористость фильтра (Ф.Евр.) (1)	Максимальный диаметр пор в микрометрах	Германия	Франция	Великобритания	#
-	менее 1.0	-	-	-	ПОР 1.0
1.6	менее 1.6	5f	-	-	ПОР 1.6
-	1-2.5	5		5	
-	1.6-3	-	-	-	ПОР 3.0
4	1.6-4	-	-	-	
-	4-6	-	5	-	
-	3-10	-	-	-	ПОР 10
10	4-10	4f	-	4	
16	10-16	4	4	-	ПОР 16
40	16-40	3	3	3	ПОР 40
-	40-50	-	-	2	
100	40-100	2	2	-	ПОР 100
-	100-120	-	-	1	
160	100-160	1	1	-	ПОР 160
-	150-200	0	0	-	
250	160-250	-	-	-	ПОР 250
-	200-500	-	00	-	
500#	250-500	-	-	-	ПОР 500

(1) Европейская фармакопея приняла систему, предложенную Международной Организацией по Стандартизации (ISO).

Возможно следующее применение фильтров (диаметр в микрометрах), пределы которых являются приблизительными:

< 2.5 Бактериологическое фильтрование;

4-10 Ультратонкое фильтрование, отделение микроорганизмов большого диаметра;

10-40 Аналитическое фильтрование, очень тонкое фильтрование ртути, очень тонкое диспергирование газов;

40-100 Тонкое фильтрование, фильтрование ртути, тонкое диспергирование газов;

100-160 Грубое фильтрование, диспергирование и промывка газов, использование в качестве подложки для других фильтрующих материалов;

160-500 Очень грубое фильтрование частиц, диспергирование и промывка газов.

При проведении химических работ возможно применение фильтров с диаметром пор в микрометрах:

- менее 1,6 (фильтрование коллоидных растворов);
- 1,6-16 (фильтрование аморфных осадков);
- 16-40 (фильтрование мелкокристаллических осадков);
- 100-160 (фильтрование грубозернистых и студнеобразных осадков).

2.1.3. ЛАМПЫ С УЛЬТРАФИОЛЕТОВЫМ ИЗЛУЧЕНИЕМ ДЛЯ АНАЛИТИЧЕСКИХ ЦЕЛЕЙ

В качестве источника ультрафиолетового излучения используются пары ртути в кварцевых лампах. Для устранения испускаемого лампой видимой части спектра используется подходящий фильтр. Если Фармакопея предписывает использование в тесте ультрафиолетовой лампы с длиной волны 254 нм или 365 нм, используется прибор, состоящий из лампы, содержащей пары ртути и фильтра, дающего спектр излучения с максимальной интенсивностью около 254 нм или 365 нм. Используемая лампа должна быть в состоянии точно указывать на наличие стандартного пятна натрия салицилата с диаметром около 5 мм на пластинке силикагеля GR, причем пятно должно исследоваться в положении перпендикулярном к излучению лампы.

Для этой цели используют 5 мкг *раствора натрия салицилата Р* в *спирте Р* (спирт не должен флуоресцировать) с концентрацией 0,4 г/л для ламп с максимальным излучением 254 нм и 5 мкл раствора в *спирте Р* с концентрацией 2 г/л для ламп с максимальным излучением 365 нм. Расстояние между лампой и хроматографической пластинкой, указанное в частной статье, не должно превышать расстояния при проведении вышеуказанного испытания.

2.1.4. СИТА

Сита с квадратными отверстиями изготавливают из соответствующих материалов. Для неаналитических процедур могут быть использованы сита с круглыми отверстиями, диаметр которых в 1,25 раза превышает размер стороны квадратного отверстия сита соответствующего номера. Не должно быть взаимодействия между материалом, из которого изготовлено сито, и веществом, которое просеивают. Измельченность указывают в частной статье, используя номер сита, соответствующий номинальному размеру стороны отверстия в микрометрах, который приводится в скобках после названия вещества.

Максимальный допуск (см. Международный Стандарт ISO 3310/1(1975) для размера отверстия *(+X)* вычисляют по формуле:

$$X = \frac{2(w^{0,75})}{3} + 4(w^{0,25}),$$

где:
ω – номинальный размер отверстия.

Не должно быть отверстий, размер которых превышает номинальный размер более, чем на величину *X*.

Допуск для среднего значения размера отверстия *(±Y)* вычисляют по формуле:

$$Y = \frac{w^{0,98}}{27} + 1,6$$

Средний размер отверстия не должен отклоняться от номинального размера более чем на величину *±Y.*

Промежуточный допуск *(+Z*) вычисляют по формуле:

$$Z = \frac{X + Y}{2}$$

Не более 6% общего числа отверстий могут иметь размеры между номинальный +*X*» и «номинальный +*Z*».

Диаметр *d* проволоки, применяемой для плетения металлической проволочной ткани, вставленной в рамку, представлен в Табл. 2.1.4.-1.

Таблица 2.1.4.-1.

Номер сита (номинальный размер отверстия, мкм)	Допуск для отверстия, мкм			Диаметр проволоки, мкм		
	Максимальный допуск для отверстия	Допуск для среднего значения размера отверстия	Промежуточный допуск	Рекомендованный номинальный диаметр	Допустимый предел	
	$+X$	$\pm Y$	$+Z$	d	d_{max}	d_{min}
11200	770	350	560	2500	2900	2100
8000	600	250	430	2000	2300	1700
5600	470	180	320	1600	1900	1300
4000	370	130	250	1400	1700	1200
2800	290	90	190	1120	1300	950
2000	230	70	150	900	1040	770
1400	180	50	110	710	820	600
1000	140	30	90	560	640	480
710	112	25	69	450	520	380
500	89	18	54	315	360	270
355	72	13	43	224	260	190
250	58	9.9	34	160	190	130
180	47	7.6	27	125	150	106
125	38	5.8	22	90	104	77
90	32	4.6	18	63	72	54
63	26	3.7	15	45	52	38
45	22	3.1	13	32	37	27
38	-	-	-	30	35	24

2.1.5. ПРОБИРКИ ДЛЯ СРАВНИТЕЛЬНЫХ ИСПЫТАНЙЙ

Пробирки, используемые для сравнительных испытаний – это специально подобранные пробирки из бесцветного стекла с одинаковым внутренним диаметром, с прозрачным дном.

Слой жидкости исследуется сверху вниз по вертикальной оси пробирки на белом фоне или, при необходимости, на черном фоне. Испытание проводят при рассеянном свете.

Обычно используются пробирки с внутренним диаметром 16 мм. Пробирки с большим внутренним диаметром могут быть использованы вместо вышеупомянутых при условии увеличения объема испытуемой жидкости настолько, чтобы высота жидкости в пробирках была не ниже, чем при аналогичном испытании с использованием жидкости в пробирках с внутренним диаметром 16 мм.

2.1.6. ИНДИКАТОРНЫЕ ТРУБКИ

Индикаторные трубки – это цилиндрические, герметичные, сделанные из инертного прозрачного материала трубки, заполненные твердым носителем, на пористую поверхность которого нанесен хромогенный реагент (индикатор), изменяющий окраску при прохождении через него определяемого компонента газовой смеси. Индикаторные трубки могут содержать адсорбирующие фильтры для удаления веществ, мешающих определяемому компоненту. Слой индикатора состоит из одного или нескольких реагентов (монослойная или многослойная трубка).

Испытания проводят путем пропускания требуемого объема газа через индикаторную трубку. Длина окрашенного слоя или интенсивность изменения цвета на градуировочной шкале является функцией и мерой массовой концентрации определяемого компонента.

Проверка индикаторных трубок проводится в соответствии с инструкциями изготовителя.

Подготовка к измерению. Проводят согласно инструкциям изготовителя или следующим образом. Устройство для подачи газа подсоединяют к регулятору давления с игольчатым клапаном. Соединяют гибкий шланг трубки с Y-частью клапана и продувают систему (Рис. 2.1.6.-1). Присоединяют открытый конец индикаторный трубки к короткому концу шланга и регулируют насосом объем анализируемого газа, проходящего через трубку. Записывают значения, соответствующие длине окрашенного слоя или интенсивности цвета на градуировочной шкале. При отрицательном результате анализа индикаторная трубка должна быть откалибрована газом, содержащим соответствующую примесь.

Ввиду использования в воздухозаборном устройстве масла, необходимо проверить реакцию трубки на используемое масло. Информация о реакционной способности для различных масел приводится в сопроводительном листке, прилагаемом к трубке. Если используемое масло не указано в сопроводительном листке, изготовитель трубки должен проверить реакционную способность и, при необходимости, обеспечить прибор специальной трубкой для данного масла.

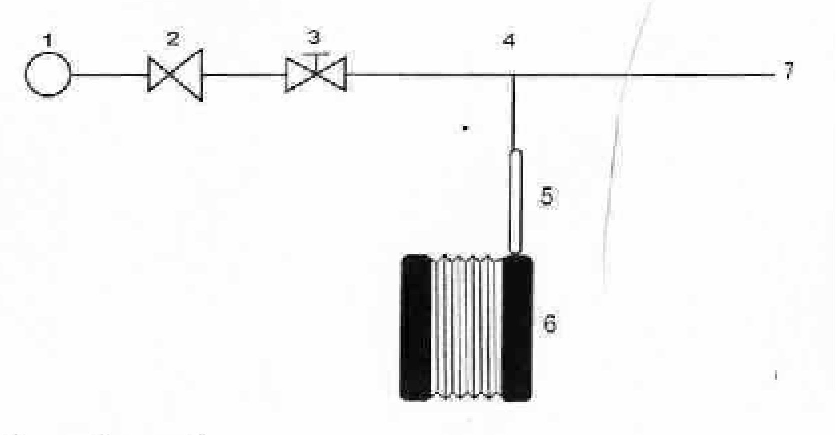


Рисунок 2.1.6.-1. Прибор для индикаторных трубок
1. - Подача газа; 2. – Регулятор давления; 3. – Игольчатый клапан;
4.- «Y» конец; 5.- Индикаторная трубка; 6.- Насос для индикаторной трубки;
7.- Открытый конец для выхода газа в атмосферу.

Индикаторная трубка для диоксида углерода. Герметичная стеклянная трубка, содержащая адсорбирующие фильтры и подходящие носители для гидразина и индикатора кристаллического фиолетового. Минимальная определяемая концентрация – 100 ppm с относительным стандартным отклонением ±15%.

Индикаторная трубка для диоксида серы. Герметичная стеклянная трубка, содержащая адсорбирующие фильтры и подходящие носители для йода и крахмального индикатора. Минимальная определяемая концентрация – 0,5 ppm с относительным стандартным отклонением ±15%.

Индикаторная трубка для масел. Герметичная стеклянная трубка, содержащая адсорбирующие фильтры и подходящие носители для индикатора кислоты серной. Минимальная определяемая концентрация – 0,1 мг/м^3 с относительным стандартным отклонением ±30%.

Индикаторная трубка для оксида азота (I) и диоксида азота. Герметичная стеклянная трубка, содержащая адсорбирующие фильтры и подходящие носители для окисляющегося слоя (соль Cr(VI)) и дифенилбензидинового индикатора. Минимальная определяемая концентрация – 0,5 ppm с относительным стандартным отклонением ±15%.

Индикаторная трубка для оксида углерода. Герметичная стеклянная трубка, содержащая адсорбирующие фильтры и подходящие носители для индикаторов йода (V) оксида, селена диоксида и кислоты серной. Минимальная определяемая концентрация – 0,5 ppm с относительным стандартным отклонением ±15%.

Индикаторная трубка для сероводорода. Герметичная стеклянная трубка, содержащая адсорбирующие фильтры и подходящие носители для индикатора соли свинца. Минимальная определяемая концентрация – 2 ppm с относительным стандартным отклонением ±10%.

Индикаторная трубка для паров воды. Герметичная стеклянная трубка, содержащая адсорбирующие фильтры и подходящие носители для индикатора перхлората магния. Минимальная определяемая концентрация – 67 ppm с относительным стандартным отклонением ±20%.

2.2. ФИЗИЧЕСКИЕ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

2.2.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОЗРАЧНОСТИ И СТЕПЕНИ МУТНОСТИ ЖИДКОСТЕЙ

Для определения прозрачности и степени мутности жидкостей используют одинаковые пробирки из бесцветного, прозрачного и нейтрального стекла с плоским дном, которые имеют внутренний диаметр от 15 мм до 25 мм. Слой испытуемой жидкости толщиной 40-мм сравнивают с 40-мм слоем свежеприготовленного, как описано ниже, эталона. Сравнение растворов проводят при рассеянном дневном освещении через 5 минут после приготовления эталона, просматривая объекты вдоль вертикальной оси пробирок на черном фоне. Рассеянный свет должен быть таким, чтобы эталон I легко отличался от воды, а эталон II легко отличался от эталона I.

Прозрачными считаются жидкости, которые по прозрачности не отличаются от *воды Р* или раствора, который используют при приготовлении жидкости в описанных выше условиях, или которые не превышают по интенсивности мутность эталонной суспензии I.

РЕАКТИВЫ

Раствор гидразина сульфата. 1.0 г *гидразина сульфата Р* растворяют в *воде Р* и доводят объем раствора *водой Р* до 100.0 мл. Раствор выдерживают в течение 4 – 6 часов.

Раствор гексаметилентетрамина. 2.5 г *гексаметилентетрамина Р* растворяют в 25.0 мл *воды Р* в колбе с притертой пробкой вместимостью 100 мл.

Исходная суспензия. 25.0 мл раствора гидразина сульфата прибавляют к приготовленному раствору гексаметилентетрамина, перемешивают и оставляют на 24 часа. Суспензия стабильна в течение 2 месяцев при хранении в стеклянной посуде, которая не имеет дефектов поверхности. Частицы суспензии могут прилипать к стеклу, поэтому перед применением суспензию тщательно взбалтывают.

Основная суспензия. 15.0 мл исходной суспензии помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл и доводят *водой Р* до метки. Срок годности основной суспензии 24 часа.

Эталоны. Приготовление эталонов проводят в соответствии с Табл. 2.2.1.-1 Основную суспензию и *воду Р* смешивают, перемешивают и используют непосредственно перед применением.

Таблица 2.2.1.-1.

	Эталон			
	I	II	III	IV
Основная суспензия, мл	5,0	10,0	30,0	50,0
Вода Р, мл	95,0	90,0	70,0	50,0

Примечание: перед применением исходную суспензию, основную суспензию и эталон следует тщательно перемешать в течение 3 минут.

2.2.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТЕПЕНИ ОКРАШИВАНИЯ ЖИДКОСТЕЙ

Определение степени окрашивания жидкостей в ряду коричневый-желтый-красный проводят визуально путем сравнения с соответствующими эталонами (раствоврами сравнения) одним из двух описанных ниже методов настоящей статьи.

Раствор считается бесцветным, если он выдерживает сравнение с *водой Р* или растворителем, или окрашен не более интенсивно, чем эталон B_9.

МЕТОД I

2.0 мл испытуемой жидкости сравнивают с 2.0 мл *воды Р* или растворителя, или эталона (см. Таблицы эталонов), описанного в настоящей статье, используя одинаковые пробирки из бесцветного, прозрачного, нейтрального стекла с внешним диаметром 12 мм. Сравнение окраски проводят при рассеянном дневном отраженном освещении, просматривая объекты горизонтально (перпендикулярно оси пробирок) на белом матовом фоне.

Примечание:

по методу I обычно проводят сравнение окрашивания жидкостей с эталонами [B(К), BY(КЖ), Y(Ж), GY(ЗЖ), R(Кр)]$_{1\text{-}3}$;

эталоны для определения степени окрашивания жидкостей по методу I хранят в защищенном от света месте в запаянных пробирках из бесцветного, прозрачного, нейтрального стекла с внешним диаметром 12 мм, либо используют основные растворы, приготовленные непосредственно перед применением.

МЕТОД II

40-мм слой испытуемой жидкости сравнивают с 40-мм слоем *воды Р* или раствора, или эталона (см. Таблицы эталонов), указанного в частной статье, используя одинаковые пробирки из бесцветного, прозрачного, нейтрального стекла с плоским дном, которые имеют внутренний диаметр от 15 мм до 25 мм. Сравнение окраски проводят при рассеянном дневном освещении, просматривая объекты вдоль вертикальной оси пробирок на белом фоне.

Примечание:

по методу II обычно проводят сравнение окрашивания жидкостей с эталонами [B(К), BY(КЖ), Y(Ж), GY(ЗЖ), R(Кр)]$_{4\text{-}9}$;

эталоны для определения степени окрашивания жидкостей по методу II приготавливают из основных растворов непосредственно перед применением.

ЭТАЛОНЫ (РАСТВОРЫ СРАВНЕНИЯ)

Исходные растворы

Желтый раствор. 46 г *железа (III) хлорида Р* помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, растворяют в 900 мл смеси *кислота хлористоводородная Р - вода Р* (25:975), доводят объем раствора этой же самой смесью до метки и перемешивают. Определяют концентрацию полученного раствора и разбавляют раствор этой же самой смесью таким образом, чтобы содержание $FeCl_3·6H_2O$ в 1 мл равнялось 45,0 мг.

Раствор хранят в защищенном от света месте.

Определение концентрации. 10,0 мл полученного раствора помещают в коническую колбу с притертой пробкой вместимостью 250 мл, добавляют 15 мл *воды Р*, 5 мл *кислоты хлористоводородной Р* и 4 г *калия йодида Р,* колбу закрывают и помещают на 15 минут в темное место. Добавляют 100 мл *воды Р* и выделившийся йод *титруют 0,1 М раствором натрия тиосульфата*, добавляя в конце титрования в качестве индикатора 0,5 мл *раствора крахмала Р*.

1 мл *0,1 М раствора натрия тиосульфата* соответствует 27,03 мг, $FeCl_3·6H_2O$.

Красный раствор. 60 г *кобальта хлорида Р* помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, растворяют в 900 мл смеси *кислота хлористоводородная – вода Р* (25:975), доводят объем раствора этой же самой смесью до метки и перемешивают. Определяют концентрацию полученного раствора и разбавляют раствор этой же самой смесью таким образом, чтобы содержание $CoCl_2·6H_2O$ в 1 мл равнялось 59,5 мг.

Определение концентрации. 5,0 мл полученного раствора помещают в коническую колбу вместимостью 250 мл с притертой пробкой, добавляют 5 мл

раствора перекиси водорода разведенного Р и 10 мл раствора 300 г/л *натрия гидроксида Р*, осторожно кипятят в течение 10 минут, охлаждают и добавляют 60 мл *кислоты серной разведенной Р* и 2 г *калия йодида Р*. Колбу закрывают и осторожно встряхивают до полного растворения осадка. Выделившийся йод титруют *0,1 М раствором натрия тиосульфата*, добавляя в конце титрования в качестве индикатора 0,5 мл *раствора крахмала Р* и титруют до бледно-розового окрашивания.

1 мл *0,1М раствора натрия тиосульфата* соответствует 23,79 мг $CoCl_2 \cdot 6H_2O$.

Синий раствор. 63 г *меди сульфата Р* помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, растворяют в 900 мл смеси *кислота хлористоводородная Р – вода Р* (25:975), доводят объем раствора этой же самой смесью до метки и перемешивают. Определяют концентрацию полученного раствора и разбавляют раствор этой же самой смесью таким образом, чтобы содержание $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ в 1 мл равнялось 62,4 мг.

Определение концентрации. 10,0 мл полученного раствора помещают в коническую колбу вместимостью 250 мл с притертой пробкой, добавляют 50 мл *воды Р*, 12 мл *кислоты уксусной разведенной Р* и 3 г *калия йодида Р.* Выделившийся йод титруют *0,1 М раствором натрия тиосульфата*, добавляя в конце титрования в качестве индикатора 0,5 мл *раствора крахмала Р* и титруют до бледно-коричневого окрашивания.

1 мл *0,1 М раствора натрия тиосульфата* соответствует 24,97 мг $CuSO_4 \cdot 5H_2O$.

Основные растворы

Пять основных растворов приготавливают с использованием трех исходных как указано в Табл. 2.2.2.-1.

Таблица 2.2.2.-1.

Основные растворы

Основной раствор	**Объем в миллилитрах**			
	Желтый раствор	**Красный раствор**	**Синий раствор**	**Раствор кислоты хлористоводородной (10 г/л HCl)**
B (К - коричневый)	3,0	3,0	2,4	1,6
BY(КЖ - коричневато-желтый)	2,4	1,0	0,4	6,2
Y(Ж - желтый)	2,4	0,6	0,0	7,0
GY(ЗЖ - зеленовато-желтый)	9,6	0,2	0,2	0,0
R(Кр - красный)	1,0	2,0	0,0	7,0

Эталоны для методов I и II приготавливают из пяти основных растворов

Таблица 2.2.2.-2.

Эталоны шкалы B (K)

Объем в миллилитрах		
Эталон	**Основной раствор B**	**Раствор кислоты хлористоводородной (10 г/л HCl)**
$B\ (К)_1$	75,0	25,0
$B\ (К)_2$	50,0	50,0
$B\ (К)_3$	37,5	62,5
$B\ (К)_4$	25,0	75,0
$B\ (К)_5$	12,5	87,5
$B\ (К)_6$	5,0	95,0
$B\ (К)_7$	2,5	97,5
$B\ (К)_8$	1,5	98,5
$B\ (К)_9$	1,0	99,0

Таблица 2.2.2.-3.

Эталоны шкалы BY (КЖ)

Объем в миллилитрах		
Эталон	**Основной раствор BY**	**Раствор кислоты хлористоводородной (10 г/л HCl)**
$BY\ (КЖ)_1$	100,0	0,0
$BY\ (КЖ)_2$	75,0	25,0
$BY\ (КЖ)_3$	50,0	50,0
$BY\ (КЖ)_4$	25,0	75,0
$BY\ (КЖ)_5$	12,5	87,5
$BY\ (КЖ)_6$	5,0	95,0
$BY\ (КЖ)_7$	2,5	97,5

Таблица 2.2.2.-4.

Эталоны шкалы Y (Ж)

Объем в миллилитрах		
Эталон	**Основной раствор Y**	**Раствор кислоты хлористоводородной (10 г/л HCl)**
$Y\ (Ж)_1$	100,0	0,0
$Y\ (Ж)_2$	75,0	25,0
$Y\ (Ж)_3$	50,0	50,0
$Y\ (Ж)_4$	25,0	75,0
$Y\ (Ж)_5$	12,5	87,5
$Y\ (Ж)_6$	5,0	95,0
$Y\ (Ж)_7$	2,5	97,5

Таблица 2.2.2.-5.

Эталоны шкалы GY (ЗЖ)

Объем в миллилитрах		
Эталон	**Основной раствор GY**	**Раствор кислоты хлористоводородной (10 г/л HCl)**
$GY\ (ЗЖ)_1$	25,0	75,0
$GY\ (ЗЖ)_2$	15,0	85,0
$GY\ (ЗЖ)_3$	8,5	91,5
$GY\ (ЗЖ)_4$	5,0	95,0
$GY\ (ЗЖ)_5$	3,0	97,0
$GY\ (ЗЖ)_6$	1,5	98,5
$GY\ (ЗЖ)_7$	0,75	99,25

Таблица 2.2.2.-6.

Эталоны шкалы R (Кр)

Объем в миллилитрах		
Эталон	**Основной раствор R**	**Раствор кислоты хлористоводородной (10 г/л HCl)**
R $(Кр)_1$	100,0	0,0
R $(Кр)_2$	75,0	25,0
R $(Кр)_3$	50,0	50,0
R $(Кр)_4$	37,5	62,5
R $(Кр)_5$	25,0	75,0
R $(Кр)_6$	12,5	87,5
R $(Кр)_7$	5,0	95,0

Примечание:

название цветов эталонов даны по первым буквам английских (русских) названий этих цветов;

степень окрашивания испытуемого раствора не должна превышать степени окрашивания соответствующего эталона, а цвет испытуемого раствора должен быть максимально приближен к цвету соответствующего эталона;

срок годности первичных и основных растворов при хранении в защищенном от света месте в штанглазах с притертой пробкой 1 год.

2.2.3. ПОТЕНЦИОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ pH

Водородным показателем (pH) называется отрицательный десятичный логарифм активности ионов водорода.

$$pH = -\log a_H +$$

pH – число, характеризующее концентрацию (активность) ионов водорода в водных растворах. На практике pH определяют экспериментально. pH исследуемого раствора связан с pH стандартного раствора (pH_S) следующим уравнением:

$$pH = pH_S - \frac{E - E_S}{k},$$

где:

E – потенциал электрода в исследуемом растворе, в вольтах;

E_S – потенциал того же электрода в растворе с известным pH (pH_S), вольтах;

k – температурный коэффициент.

Таблица 2.2.3.-1.

Значения k при разных температурах

Температура ^oC	*k*
15	0.0572
20	0.0582
25	0.0592
30	0.0601
35	0.0611

Температурный коэффициент (*k*), выраженный в вольтах, при какой-либо температуре может быть рассчитан по формуле:

$$k = 0{,}05916 + 0{,}000198(t - 25^0 C).$$

Потенциометрическое определение pH проводят путем измерения разности потенциалов между двумя электродами, погруженными в исследуемый раствор: один из электродов чувствителен к ионам водорода (обычно это стеклянный электрод), другой – электрод сравнения (например, насыщенный каломельный электрод).

Прибор. Измерительным прибором служит вольтметр с входным сопротивлением, в 100 раз превышающим сопротивление электродов. Прибор обычно градуирован в единицах pH и должен иметь такую чувствительность, чтобы можно было провести измерение с точностью не менее 0,05 единиц pH или не менее 0,003 В.

Методика. Все измерения проводят при одной и той же температуре в интервале от 20°С до 25°С, если отсутствуют иные указания в частной статье. Таблица 2.2.3.-2 показывает зависимость значения pH от температуры для разных стандартных буферных растворов, используемых для калибровки. При необходимости используют температурные поправки в соответствии с инструкцией предприятия-производителя. Прибор калибруют с помощью буферного раствора калия гидрофталата (первичный стандарт) и одного из буферных растворов с другим значением pH (желательно из одного, указанных в Табл.2.2.3.-2). Показания прибора для третьего буферного раствора с промежуточным значением pH не могут отличаться больше чем на 0.05 единиц pH от табличного значения pH, соответствующего этому раствору. Электроды погружают в исследуемый раствор и измеряют pH при тех же условиях, что и для буферных растворов.

Подготовка прибора, электродной системы, а также градуировка прибора проводится согласно инструкциям, прилагаемым к прибору. Если прибор используется ежедневно, его градуировку проводят регулярно (не реже одного раза в неделю). В противном случае градуировку прибора проводят перед каждым измерением.

Все исследуемые растворы и стандартные буферные растворы должны быть приготовлены на *воде, не содержащей диоксида углерода Р*.

Приготовление стандартных буферных растворов

0,05 М раствор калия тетраоксалата. 12,61 г $KC_4H_3O_8 \cdot 2H_2O$ растворяют в *воде Р* и доводят объем раствора этим же растворителем до 1000,0 мл.

Насыщенный при 25°С раствор калия гидротартрата. Избыток $C_4H_5KO_6$ смешивают при энергичном встряхивании с *водой Р* при температуре 25°С в течение 30 мин. Фильтруют или сливают надосадочную жидкость (декантируют). Раствор используют свежеприготовленным.

0,05 М раствор калия дигидроцитрата. 11,41 г $KC_6H_7O_7$ растворяют в *воде Р* и доводят объем этим же растворителем до 1000,0 мл. Раствор используют свежеприготовленным.

0,05 М раствор калия гидрофталата. 10,13 г $KC_8H_5O_4$, предварительно высушенного при температуре от 110°С до 135°С до постоянной массы, растворяют в *воде Р* и доводят этим же растворителем до 1000,0 мл.

0,025 М раствор калия дигидрофосфата и 0,025 М раствор натрия гидрофосфата. 3,39 г KH_2PO_4 и 3,53 г Na_2HPO_4, предварительно высушенных в течение 2 часов при температуре от 110°С до 130°С до постоянной массы, растворяют в *воде Р* и доводят объем эим же растворителем до 1000,0 мл.

0,0087 М раствор калия дигидрофосфата и 0,0303 М раствор натрия гидрофосфата. 1,18 г KH_2PO_4 и 4,30 г Na_2HPO_4, предварительно высушенных при температуре от 110°С до 130°С в течение 2 часов, растворяют в *воде Р* и доводят объем этим же растворителем до 1000,0 мл.

0,01 М раствор натрия тетрабората. 3,80 г $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ растворяют в *воде Р* и доводят этим же растворителем до 1000,0 мл. Хранят в защищенном от диоксида углерода месте.

0,025 М раствор натрия карбоната и 0,025 М раствор натрия гидрокарбоната. 2,64 г Na_2CO_3 и 2,09 г $NaHCO_3$ растворяют в *воде Р* и доводят объем раствора этим же растворителем до 1000,0 мл.

Таблица 2.2.3.-2.

РН стандартных буферных растворов при разных температурах

Температура °C	***0,05 М раствор калия тетраоксалата***	***Насыщенный при 25°C раствор калия гидротартрата***	***0,05 М раствор калия дигидроцитрата***	***0,05 М раствор калия гидрофталата*** **$KC_8H_5O_4$**	***0,025 М раствор калия дигидрофосфата и 0,025 М раствор натрия гидрофосфата***	***0,0087 М раствор калия дигидрофосфата и 0,0303 М раствор натрия гидрофосфата***	***0,01 М раствор натрия тетрабората***	***0,025 М раствор натрия карбоната и 0,025 М раствор натрия гидрокарбоната***
	$KC_4H_3O_8 \cdot 2H_2O$	$C_4H_5KO_6$	$KC_6H_7O_7$	$KC_8H_5O_4$	KH_2PO_4 + Na_2HPO_4	KH_2PO_4 + Na_2HPO_4	$Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$	Na_2CO_3 $NaHCO_3$
15	1,67		3,80	4,00	6,90	7,45	9,28	10,12
20	1,68		3,79	4,00	6,88	7,43	9,23	10,06
25	1,68	3,56	3,78	4,01	6,87	7,41	9,18	10,01
30	1,68	3,55	3,77	4,02	6,85	7,40	9,14	9,97
35	1,69	3,55	3,76	4,02	6,84	7,39	9,10	9,93
(1) $\frac{\Delta pH}{\Delta t}$	+0,001	-0,0014	-0,0022	+0,0012	-0,0028	-0,0028	-0,0082	-0,0096

(1) – изменение pH на градус по Цельсию

\# Примечание:

Для приготовления стандартных буферных растворов могут быть использованы реактивы квалификации “Для pH-метрии”, х.ч., ч.д.а. Буферные растворы хранят в хорошо закрытых склянках нейтрального стекла в течение 3 месяцев. При образовании осадков и видимых изменений буферные растворы не применяются.

Допускается определение pH в смешаных водно-органических растворах и некоторых коллоидных системах. При этом полученные значения pH являются условными.

2.2.4. ЗАВИСИМОСТЬ МЕЖДУ РЕАКЦИЕЙ РАСТВОРА, ПРИБЛИЗИТЕЛЬНЫМ ЗНАЧЕНИЕМ pH И ЦВЕТОМ ИНДИКАТОРОВ

К 10 мл исследуемого раствора прибавляют 0,1 мл раствора индикатора, который подбирают в соответствии с Табл.2.2.4.-1.

Таблица 2.2.4.-1.

Реакция раствора	pH	Индикатор	Цвет
Щелочная	> 8	Лакмусовая бумага Тимоловый синий[1]	Синий Серый или фиолетово-синий
Слабощелочная	8,0 – 10,0	Фенолфталеин[1] Тимоловый синий[1]	От бесцветного до розового Серый
Сильнощелочная	> 10,0	Фенолфталеиновая бумага Тимоловый синий[1]	Красный Фиолетово-синий
Нейтральная	6,0 – 8,0	Метиловый красный Феноловый красный[1]	Желтый Желтый или розовый
#Нейтральная по тропеолину 00	> 3,0	Тропеолин 00	Желтый
#Нейтральная по диметиловому желтому	> 4,0	Диметиловый желтый[1]	Желтый, красный после прибавления 0,1мл 0,1М раствора кислоты
Нейтральная по метиловому красному	4,5 – 6,0	Метиловый красный	Оранжево-красный
Нейтральная по фенолфталеину	< 8,0	Фенолфталеин [1]	Бесцветный; розовый или красный после прибавления 0,05мл 0,1М раствора основания
Кислая	< 6,0	Метиловый красный Бромтимоловый синий[2]	Оранжевый или красный Желтый
Слабокислая	4,0 – 6,0	Метиловый красный Бромкрезоловый зеленый	Оранжевый Зеленый или синий
Сильнокислая	< 4,0	Конго красного бумага	Зеленый или синий

Примечание:
[1]используют 0,05 мл раствора реактива с обозначением *Р*;
[2]используют раствор *бромтимолового синего Р1*;
*применяемые в Республике Беларусь.

Дополнительная информация зависимости между реакцией раствора, приблизительным значением pH и цветом индикаторов представлена в Табл.2.2.4.-2.

Таблица 2.2.4.-2.

Интервалы pH и изменения цвета индикаторов

Название индикатора	**Интервал pH перехода цвета**	**Изменение цвета**
Метиловый фиолетовый	0,1-1,5	Желтый - зеленый
Малахитовый зеленый	0,1-2,0	Желтый - зеленовато-голубой
Крезоловый красный	0,2-1,8	Красный - желтый
Крезоловый пурпуровый	1,2-2,8	Розовато-красный - желтый
Тимоловый синий	1,2-2,8	Красный - желтый
Тропеолин 00	1,4-3,2	Красный - желтый
Метиловый фиолетовый	1,5-3,2	Зеленый - фиолетовый
Диметиловый желтый	3,0-4,0	Красный - желтый
Метиловый оранжевый	3,0-4,4	Красный - желтый
Бромфеноловый синий	3,0-4,6	Желтый - синий
Конго красный	3,0-5,2	Сине-фиолетовый - красный
Бромкрезоловый зеленый (синий)	3,8-5,4	Желтый - синий
Ализариновый красный С	4,6-6,0	Желтый – пурпурно-красный
Метиловый красный	4,2-6,2	Красный - желтый
Лакмус	4,4-6,2	Красный - синий
Бромкрезоловый пурпуровый	5,2-6,8	Желтый - пурпуровый
Бромтимоловый синий	6,0-7,6	Желтый - синий
Нейтральный красный	6,8-8,0	Красный - желтый
Феноловый красный	6,8-8,4	Желтый - красный
Крезоловый красный	7,2-8,8	Желтый – пурпурно-красный
α-Нафтолфталеин	7,4-8,6	Желтовато-розовый – зеленовато-синий
Крезоловый пурпуровый	7,4-9,0	Желтый - фиолетовый
Тимоловый синий	8,0-9,6	Желтый - синий
Фенолфталеин	8,2 – 10,0	Бесцветный - ярко-розовый
Тимолфталеин	9,4-10,6	Бесцветный - синий
Ализариновый желтый Р	10,0-12,0	Светло-желтый – красно-оранжевый
Малахитовый зеленый	11,4-13,0	Зеленовато-голубой - бесцветный
Индигокармин	11,6-14,0	Синий - желтый

2.2.5. ОТНОСИТЕЛЬНАЯ ПЛОТНОСТЬ

Относительная плотность d_{20}^{20} представляет собой отношение массы определенного объема вещества к массе равного его объема воды при температуре 20°С.

Относительную плотность d_{20}^{20} определяют с помощью пикнометра, плотномера, гигростатических весов или ареометра с точностью до десятичных знаков, обозначенных в частной статье. Атмосферное давление при взвешивании не учитывают, так как связанная с ним ошибка не превышает единицы в третьем десятичном знаке.

Кроме того, обычно используют два других определения.

Относительная плотность d_{4}^{20} вещества представляет собой отношение массы определенного объема вещества при температуре 20°С к массе равному ему объема воды при температуре 4°С.

Плотность ρ_{20} - это отношение массы вещества к его объему при температуре 20°С. Плотность выражают в килограммах на кубический метр
(1 кг/м^3 = 10 $^{-3}$г/см^3). # Чаще всего измерение плотности выражается в граммах на кубический сантиметр (г/см^3).

Числовые отношения между относительной плотностью и плотностью в килограммах на кубический метр выражают следующим образом:

$$\rho_{20} = 998{,}202 \cdot d_{20}^{20} \quad \text{или} \quad d_{20}^{20} = 1{,}001\ 80 \cdot 10^{-3}\ \rho_{20}$$

$$\rho_{20} = 999{,}972 \cdot d_{4}^{20} \quad \text{или} \quad d_{20}^{20} = 1{,}000\ 03 \cdot 10^{-3}\ \rho_{20}$$

$$d_{4}^{20} = 0{,}998\ 230 \cdot d_{20}^{20}$$

В тех случаях, когда для вещества регламентируют значение плотности, ее определение проводят одним из нижеуказанных способов, если нет других указаний в частной статье.

Метод 1. Применяют в случае определения плотности жидкостей с точностью до 0,001.

Чистый сухой пикнометр взвешивают с точностью до 0,0002 г, заполняют при помощи сухой воронки *водой Р* чуть выше метки, закрывают пробкой и выдерживают на протяжении 20 минут в термостате, в котором поддерживают постоянную температуру воды 20°С с точностью до 0,1°С. При этой температуре уровень воды в пикнометре доводят до метки, быстро отбирая избыток воды при помощи пипетки или завернутой в трубку полоски фильтровальной бумаги. Пикнометр снова закрывают пробкой и выдерживают в термостате еще 10 минут, проверяя положение мениска по отношению к метке. Затем пикнометр вынимают из термостата, фильтровальной бумагой вытирают внутреннюю поверхность шейки пикнометра, а также весь пикнометр снаружи, оставляют под стеклом весов на протяжении 10 минут и взвешивают с точностью, указанной выше.

Пикнометр освобождают от воды, высушивают, ополаскивая последовательно спиртом и эфиром (сушить пикнометр путем нагревания не допускается), удаляют остаток эфира продуванием воздуха, заполняют пикнометр испытуемой жидкостью и затем проводят те же операции, что и с *водой Р.*

Плотность ρ_{20} (г/см^3) вычисляют по формуле:

$$r_{20} = \frac{(m_2 - m) \cdot 0{,}99703}{m_1 - m} + 0{,}0012,$$

где:

m - масса пустого пикнометра, в граммах;
m_1 - масса пикнометра с *водой Р*, в граммах;
m_2 - масса пикнометра с испытуемой жидкостью, в граммах;
0,99703 - значение плотности воды при 20°С (в г/см^3 с учетом плотности воздуха);
0,0012 - плотность воздуха при 20°С и барометрическом давлении 1011 гПА (760 мм рт.ст).

Метод 2. Применяют в случае определения плотности жидкостей с точностью до 0,01.

Испытуемую жидкость помещают в цилиндр и при температуре жидкости 20°С осторожно опускают в нее чистый сухой ареометр, шкала которого позволяет определить ожидаемую величину плотности. Ареометр не выпускают из рук пока не станет очевидным, что он плавает; при этом необходимо следить, чтобы ареометр не касался стенок и дна цилиндра. Отсчет плотности проводят через 3-4 минуты после погружения ареометра по делению на шкале, соответствующему нижнему мениску жидкости (при отсчете глаз должен быть на уровне мениска).

Примечание:

определение плотности сильнолетучих веществ ареометром не допускается;

в случае определения темноокрашенных жидкостей отсчет производят по верхнему мениску.

Метод 3. Применяют для определения плотности твердых жиров и воска. Точно взвешивают пустой пикнометр, затем взвешивают тот же пикнометр, заполненный *водой Р*, температура которой 20°С. После этого воду удаляют и пикнометр высушивают. Все операции проводят, соблюдая условия, указанные в методе 1.

В пикнометр вливают при помощи пипетки или небольшой воронки с тонкооттянутым концом расплавленый жир или воск в таком количестве, чтобы он занимал 1/3 – 1/2 объема пикнометра. Пикнометр ставят на 1 час без пробки в горячую воду, затем охлаждают до 20°С и взвешивают; доводят до метки водой Р при 20°С, вытирают насухо и вновь взвешивают. В обеих фазах и на поверхности их раздела не должно быть пузырьков воздуха.

Плотность вычисляют по формуле:

$$r_{20} = \frac{(m_2 - m)\cdot 0{,}99703}{(m_1 + m_2) - (m + m_3)} + 0{,}0012,$$

где:

m - масса пустого пикнометра, в граммах;
m_1 - масса пикнометра с *водой Р*, в граммах;
m_2 - масса пикнометра с жиром, в граммах;
m_3 - масса пикнометра с жиром и водой, в граммах;
0,99703 - значение плотности воды при 20°С (в г/см^3 с учетом плотности воздуха);
0,0012 - плотность воздуха при 20°С и барометрическом давлении 1011 гПА (760 мм рт.ст).

2.2.6. ПОКАЗАТЕЛЬ ПРЕЛОМЛЕНИЯ (ИНДЕКС РЕФРАКЦИИ)

Показатель преломления n_λ среды относительно воздуха равняется отношению синуса угла падения луча света в воздухе к синусу угла преломления луча света в данной среде.

Абсолютным показателем преломления называют отношение скорости распространения света в вакууме к скорости распространения света в испытуемом веществе. Относительный показатель преломления – это отношение скорости распространения света в воздухе к скорости распространения света в испытуемом веществе.

Если нет других указаний в частной статье, определение показателя преломления проводят при температуре (20±0,5)°С при длине волны линии D спектра натрия (λ=589,3 нм); показатель преломления, определенный в таких условиях, обозначают индексом n_D^{20}.

Показатель преломления зависит от температуры и длины волны света, при которой проводят определение. В растворах показатель преломления зависит также от концентрации вещества и природы растворителя.

Определение показателя преломления применяется для установления подлинности и чистоты вещества. Метод применяют также для определения концентрации вещества в растворе, которую находят по графику зависимости показателя преломления от концентрации. В таком случае точность измерения показателя преломления должна быть не ниже ±2·10^{-4}. На графике выбирают интервал концентраций, в котором соблюдается линейная зависимость между коэффициентом преломления и концентрацией. В этом интервале концентрацию можно вычислить по формуле:

$$X = \frac{n - n_0}{F},$$

где:

X - концентрация вещества врастворе;
n - показатель преломления раствора;
n_0 - показатель преломления растворителя при той же температуре;
F - фактор, равный величине прироста показателя преломления при увеличении концентрации на 1% (устанавливается экспериментально).

Рефрактометры обычно определяют критический угол. В таких приборах главной частью является призма с известным показателем преломления, которая контактирует с анализируемой жидкостью.

Для калибровки приборов используют эталонные вещества, обозначенные в Табл. 2.2.6.-1. Значение показателя преломления каждой эталонной жидкости обозначается на этикетке. Градуировка приборов проводится по эталонным жидкостям, прилагаемым к приборам, или дистиллированной воде, для которой n_D^{20} = 1,3330 ($\Delta n / \Delta t$ = -0,000085).

Таблица 2.2.6.-1.

Эталонная жидкость	**$\Delta n / \Delta t$ (температурный коэффициент)**
Триметилпентан ГСО	-0,00049
Толуол ГСО	-0,00056
Метилнафталин ГСО	-0,00048

При использовании белого света рефрактометры должны быть оборудованы компенсационной системой. Прибор должен давать показания с точностью как минимум до третьего десятичного знака и обеспечивать возможность проведения операций при заданной температуре. Цена деления термометра не должна превышать 0,5°С.

2.2.7. ОПТИЧЕСКОЕ ВРАЩЕНИЕ

Оптическое вращение – это свойство вещества вращать плоскость поляризации поляризованного света.

Оптическое вращение считается положительным (+) для правовращающих веществ (то есть тех, которые вращают плоскость поляризации по часовой стрелке) и отрицательным (-) для левовращающих веществ.

Удельное оптическое вращение $[a_m]_l^t$, выраженное в радианах (рад), представляет собой вращение, вызванное слоем жидкости или раствора толщиной 1 метр, содержащим 1 килограмм оптически активного вещества в 1 метре кубическом при прохождении через него поляризованного света с длиной волны λ при температуре t. Для практических целей удельное оптическое вращение $[a_m]_l^t$ обычно выражают в миллирадианметрах квадратных на килограмм (*мрад · м² · кг⁻¹*).

Угол оптического вращения жидких веществ представляет собой угол вращения α плоскости поляризации, выраженный в градусах (°), при длине волны линии D спектра натрия (λ = 589,3 нм), измеренный при температуре 20°С в толщине слоя 1 дециметр. Для растворов способ приготовления указывают в частной статье.

Удельное оптическое вращение $[a]_D^{20}$ жидкости представляет собой угол вращения α плоскости поляризации, выраженный в градусах (°), при длине волны линии D спектра натрия (λ = 589,3 нм), измеренный при температуре 20°С, рассчитанный для толщины слоя 1 дециметр испытуемого вещества и деленный на плотность, выраженную в граммах на кубический сантиметр.

Удельное оптическое вращение$[a]_D^{20}$ вещества в растворе представляет собой угол вращения α плоскости поляризации, выраженный в градусах (°), при длине волны линии D спектра натрия (λ = 589,3 нм), измеренный при температуре 20°С в растворе испытуемого вещества, и рассчитанный для слоя 1 дециметр в пересчете на содержание 1 грамма вещества в 1 миллилитре раствора. Для удельного вращения вещества в растворе всегда указывают используемый растворитель и концентрацию раствора. Удельное оптическое вращение выражают в градус-миллилитрах на дециметр-грамм [(°) · мл · дм$^{-1}$ · г$^{-1}$].

Пересчет удельного вращения в единицах по Международной Системе в единицы, используемые Фармакопеей, проводят по формуле:

$$[a_m]_l^t = [a_m]_l^t \cdot 0{,}1745$$

В отдельных случаях, указанных в частной статье, угол вращения может быть измерен при температурах, отличных от 20°С, и при других длинах волн.

Используемый поляриметр должен обеспечивать измерения с точностью до 0.01°. Шкалу обычно проверяют при помощи сертифицированных кварцевых пластинок. Линейность шкалы может быть проверена при помощи растворов сахарозы.

Методика. Определяют ноль поляриметра и угол вращения плоскости поляризации при длине волны линии D спектра натрия (λ = 589.3 нм) при температуре (20±0.5)°С. Измерения оптического вращения могут проводиться при других температурах только в тех случаях, если в частной статье указан способ учета температуры. Определяют ноль прибора с закрытой трубкой; для жидкостей – с пустой трубкой; для растворов твердых веществ – с трубкой, заполненной соответствующим растворителем. Проводят не менее 5 измерений и рассчитывают среднее значение.

Удельное оптическое вращение вычисляют по формулам, обозначая правое и левое вращение соответственно (+) и (-).

Для жидкостей:

$$[a]_D^{20} = \frac{a}{l \cdot r_{20}}$$

Для веществ в растворе:

$$[a]_D^{20} = \frac{1000 \cdot a}{l \cdot c},$$

где:
с – концентрация вещества в растворе, в г/л.

Содержание *c* или *c'* растворенного вещества, в г/л или процентах (*м/м*) соответственно, рассчитывают по формулам:

$$c = \frac{1000 \cdot a}{l \cdot [a]_D^{20}} \qquad c` = \frac{100 \cdot a}{l \cdot [a]_D^{20} \cdot r_{20}},$$

где:
a – угол вращения, измеренный при температуре 20±0,5°С, в градусах;
l – длина поляриметрической трубки, в дециметрах;
p_{20} – плотность при температуре 20°С, в граммах на кубический сантиметр. В фармакопейном анализе плотность заменяют относительной плотностью.

2.2.8. ВЯЗКОСТЬ

\# *Вязкость* (внутреннее трение) – свойство текучих тел оказывать сопротивление передвижению одной их части относительно другой.

\# Текучие тела могут иметь ньютоновский тип течения. Ньютоновскими жидкостями называют системы, вязкость которых не зависит от напряжения сдвига и является постоянной величиной в соответствии с законом Ньютона.

Неньютоновские жидкости не попадают под действие закона Ньютона, так как их вязкость зависит от напряжения сдвига.

Для ньютоновских жидкостей различают динамическую, кинематическую, относительную, удельную, приведенную и характеристическую вязкости. Для неньютоновских жидкостей характерна, главным образом, структурная вязкость.

Динамическая вязкость или коэффициент вязкости η – это тангенциальная сила, приходящаяся на единицу поверхности, которая также называется *напряжением сдвига* t , выраженная в паскалях (Па), которую необходимо приложить для того, чтобы переместить слой жидкости площадью 1 $м^2$ со скоростью (v) 1 метр в секунду ($м \cdot с^{-1}$), находящийся на расстоянии (*x*) 1 метр относительно другого слоя, параллельно площади скольжения.

Величина *dv/dx* представляет собой градиент скорости и обусловливает скорость сдвига *D*, выраженную в обратных секундах ($с^{-1}$), таким образом: $h = t : D$.

Единицей динамической вязкости является паскаль-секунда ($Па \cdot с$). Чаще всего используется дольная единица - миллипаскаль-секунда ($мПа \cdot с$).

Кинематическая вязкость v, выраженная в метрах квадратных в секунду ($м^2 \cdot с^{-1}$), рассматривается как отношение величины динамической вязкости *η* к плотности жидкости *р*, выраженной в килограммах на метр кубический ($кг \cdot м^3$), измеренной при той же температуре: $v = h : r$.

Кинематическую вязкость обычно выражают в миллиметрах квадратных на секунду ($мм^2 \cdot с^{-1}$).

Структурная (эффективная или кажущаяся) вязкость – вязкость при данном напряжении сдвига. В ряде случаев необходимо определить вязкость одной жидкости относительно другой – *относительную вязкость* $\eta_{отн.}$

Часто используют *удельную вязкость* $\eta_{уд}$, показывающую, какой вклад в вязкость раствора вносит присутствие в нем растворенного вещества:

$$h_{уд} = \frac{h - h_o}{h_o} = \frac{h}{h_o} - 1 = h_{отн} - 1,$$

где:

η – вязкость раствора;

η_o – вязкость растворителя.

Удельную вязкость, отнесенную к единице концентрации раствора, называют *приведенной вязкостью* $\eta_{прив}$:

$$h_{прив} = \frac{h_{уд}}{c},$$

где *с* – концентрация раствора.

Для растворов полимеров вязкость является функцией молекулярных масс, формы, размеров и гибкости макромолекул. Чтобы определить структурные характеристики полимеров, приведенную вязкость экстраполируют к нулевой концентрации. В таком случае вводится понятие *характеристической вязкости* [*η*]:

$$[h] = \lim_{C \to 0} h_{прив} = \lim_{C \to 0} \frac{h_{уд}}{c}$$

Характеристическая вязкость выражается в единицах, обратных единицам концентрации.

Для определения вязкости ньютоновских жидкостей можно использовать капилярный вискозиметр; для определения вязкости как ньютоновских, так и неньютоновских жидкостей можно использовать ротационный вискозиметр.

Допускается использование и других вискозиметров с учетом, что точность и правильность измерений будут не худшими, чем на примере использования вискозиметров, описанных ниже.

2.2.9. МЕТОД КАПИЛЛЯРНОЙ ВИСКОЗИМЕТРИИ

Определение вязкости проводят, используя подходящий капиллярный вискозиметр, при температуре (20±0,1)°С, если не указана другая температура в частной статье. Время вытекания от одной отметки вискозиметра до другой измеряется секундомером с точностью до одной пятой секунды. Полученные данные годятся при условии, что результаты двух последовательных измерений отличаются не более, чем на 1%.

Время вытекания испытуемой жидкости определяют как среднее не менее трех измерений.

Динамическую вязкость η, выраженную в милипаскальсекундах (мПа · с), вычисляют по формуле:

$$h = kpt,$$

где:

k – постоянная вискозиметра, в миллиметрах квадратных на секунду в квадрате (мм^2 · с$^{-2}$);

p – плотность испытуемой жидкости, в миллиграммах на миллиметр кубический (мг · мм$^{-3}$), полученная умножением относительной плотности (d_{20}^{20}) на 0,9982;

t – время вытекания испытуемой жидкости, в секундах (*с*).

Постоянную *k* определяют с использованием соответствующей фармакопейной жидкости для калибровки вискозиметров.

Кинематическую вязкость, выраженную в миллиметрах квадратных на секунду (мм^2 · с$^{-1}$) вычисляют по формуле:

$$v = kt$$

Определение вязкости может проводиться при помощи прибора (предложен Международной организацией по стандартизации), характеристики которого представлены на Рис.2.2.9.-1 и в Табл. 2.2.9.-1.

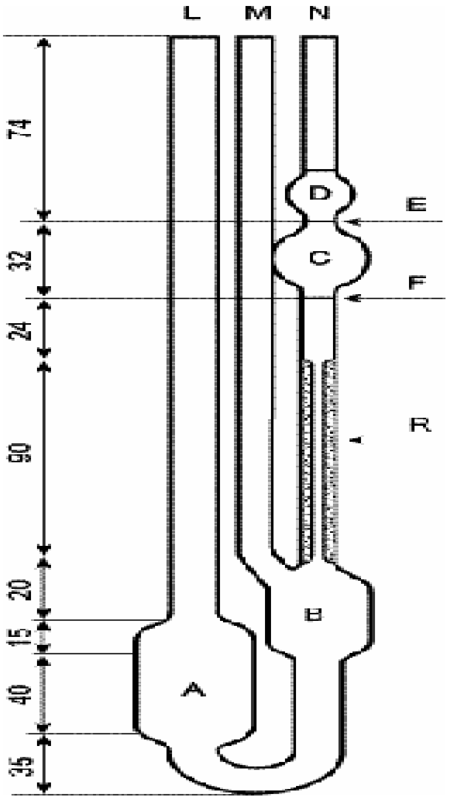


Рисунок 2.2.9.-1. *Вискозиметр с висячим уровнем. Размер представлен в миллиметрах.*

Таблица 2.2.9.-1

Размер	Номинальная постоянная вискозиметра	Диапазон кинематической вязкости	Внутренний диаметр трубки R	Объем расширения C	Внутренний диаметр трубки N
	$мм^2 \cdot с^{-2}$	$мм^2 \cdot с^{-1}$	мм (±2%)	мл (±5%)	мм
1	0,01	3,5-10	0,64	5,6	2,8-3,2
1A	0,03	6-30	0,84	5,6	2,8-3,2
2	0,1	20-100	1,15	5,6	2,8-3,2
2A	0,3	60-300	1,51	5,6	2,8-3,2
3	1,0	200-1000	2,06	5,6	3,7-4,3
3A	3,0	600-3000	2,74	5,6	4,6-5,4
4	10	2000-10000	3,70	5,6	4,6-5,4
4A	30	6000-30000	4,07	5,6	5,6-6,4
5	100	20000-100000	6,76	5,6	6,8-7,5

Минимальное время вытекания может быть 350 с на примере размера 1 и 200 с – в остальных примерах

Методика. Испытуемую жидкость, имеющую температуру 20°С, если в частной статье не обозначена другая температура, заливают в вискозиметр через трубку *(L)* в таком количестве, чтобы заполнить расширение *(A)*, но при этом уровень жидкости в расширении *(B)* должен остаться ниже выхода к вентиляционной трубке *(M)*. Вискозиметр в вертикальном положении погружают в водяную баню при температуре (20±0,1)°С, если в частной статье не указана другая температура, удерживая его в этом положении не менее 30 минут для установления температурного равновесия. Трубку *(M)* закрывают и повышают уровень жидкости в трубке *(N)* таким образом, чтобы она находилась примерно на 8 мм выше метки *(E)*. Удерживают жидкость на этом уровне, закрыв трубку *(N)* и

открыв трубку *(M)*. Затем открывают трубку *(N)* и измеряют время, за которое уровень жидкости снизится от метки *(E)* до метки *(F),* секундомером с точностью до одной пятой секунды.

Работа с прибором, описанным выше, допускает использование вискозиметров капиллярных стеклянных с висячим уровнем (например вискозиметры капиллярные стеклянные типа ВПЖ-1), параметры которого аналогичны к приведенному на Рис.1. Вязкость измеряют в соответствии с инструкцией по применению вискозиметра.

Для определения *относительной вязкости* жидкости измеряют время $t_{оср}$ вытекания между верхней и нижней отметкой вискозиметра той жидкости, относительно которой проводят измерение $\eta_{отн}$. Затем в том же чистом и сухом вискозиметре при тех же условиях определяют время вытекания $t_{ср}$ исследуемой жидкости.

Одновременно измеряют плотность жидкостей, которые изучаются, пикнометром ($\rho_{о}$ и ρ) при той же температуре, при которой определяют вязкость, и вычисляют относительную вязкость по формуле:

$$h_{отн} = \frac{t_{ср} \cdot r}{t_{Оср} \cdot r_{О}}$$

Для определения характеристической вязкости готовят не меньше пяти исследуемых растворов разной концентрации. При этом должно выполняться условие возможности линейной экстраполяции приведенной вязкости к нулевой концентрации, то есть нужно выбирать минимальные концентрации раствора в пределах чувствительности и точности метода измерения. Для каждой концентрации раствора определяют $t_{ср}$ и рассчитывают приведенную вязкость. Затем строят зависимость $\eta_{прив}$ от концентрации *c* и графически или линейным методом наименьших квадратов экстраполируют приведенную вязкость к нулевой концентрации, то есть находят характеристическую вязкость.

2.2.10. МЕТОД РОТАЦИОННОЙ ВИСКОЗИМЕТРИИ

Принцип действия чаще всего используемых ротационных вискозиметров лежит в измерении силы сдвига в жидкой среде, расположенной между двумя коаксиальными цилиндрами, один из которых вращается двигателем, а второй приводится во вращение первым. Вязкость (структурная, эффективная или кажущаяся) характеризуется углом *(M)*, на который поворачивается второй цилиндр; этот угол пропорционален моменту силы, выраженному в ньютон-метрах (Н.м.).

В случае ламинарного потока динамическую вязкость η, выраженную в паскаль-секундах (Па · с), вычисляют по формуле:

$$h = \frac{1}{w}\left(\frac{M}{4p \cdot h}\right) \cdot \left(\frac{1}{R_A^2} - \frac{1}{R_B^2}\right),$$

где:
h – глубина погружения второго цилинда в жидкую среду, в метрах;
R_A – радиус меньшего из цилиндров, в метрах;
R_B – радиус большего из цилиндров, в метрах;
w – угловая скорость, в радианах в секунду.

Постоянная вискозиметра *k* может быть определена при разных скоростях вращения с использованием фармакопейных жидкостей для калибровки вискозиметров. К промышленным вискозиметрам прилагается таблица со

значениями постоянных (k) вискозиметров в зависимости от площади поверхности цилиндров и скорости их вращения.

При этом вязкость рассчитывается по формуле:

$$h = k\frac{M}{w}$$

Методика. Вязкость измеряется в соответствии с инструкцией по применению ротационного вискозиметра. Температуру, при которой измеряют вязкость, указывают в частной статье. Для псевдопластичных и других неньютоновских систем в частной статье определяют тип вискозиметра и угловую скорость или скорость сдвига, при которой осуществляются измерения. Если невозможно получить точное значение указанной скорости, измерения проводят при несколько большей или несколько меньшей скоростях. Полученные результаты интерполируют.

Допускается использование других типов ротационных вискозиметров с коаксиальными цилиндрами, в которых вращается лишь один цилиндр.

2.2.11. ТЕМПЕРАТУРНЫЕ ПРЕДЕЛЫ ПЕРЕГОНКИ

Температурные пределы перегонки представляют собой интервал температур, приведенных к давлению 101,3 кПа (760 мм рт. ст.), в пределах которого перегоняется жидкость или некоторая ее фракция в определенных условиях.

Прибор. Прибор (Рис. 2.2.11.-1) состоит из перегонной колбы (*A*), прямого холодильника *(B)*, присоединенного к колбе с видимой стороны, и вставной трубки (алонжа) *(C)*, присоединенной к концу холодильника. В горловину колбы помещают термометр таким образом, чтобы конец ртутного резервуара находился на 5 мм ниже от нижнего края отводной трубки перегонной колбы. Используют термометр с диапазоном шкалы близкой 50°C с ценой деления 0,2 °C. Во время определения колбу, включая и горловину, предохраняют от охлаждения подходящим экраном.

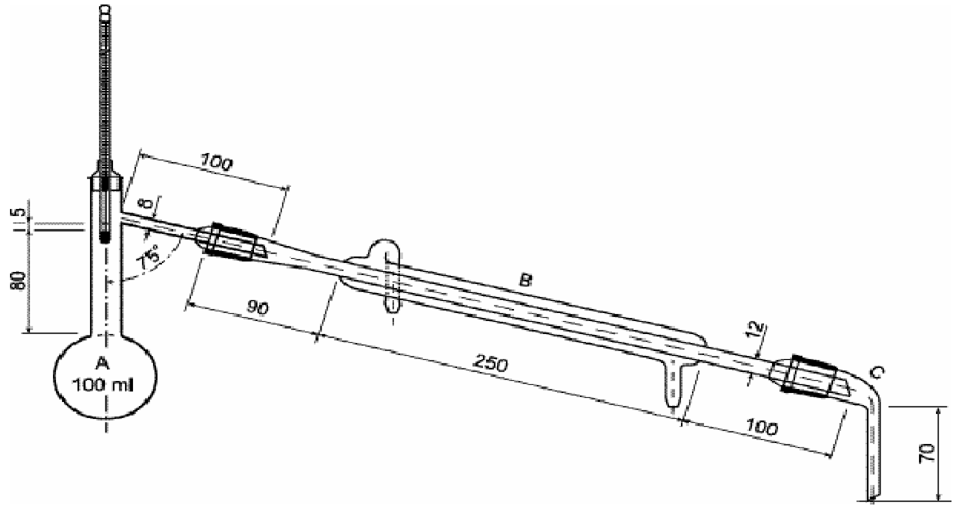


Рисунок 2.2.11.-1. *Прибор для определения температурных пределов перегонки.*
Размер представлен в миллиметрах.

Методика. 50,0 мл испытуемой жидкости и несколько кусочков пористого материала помещают в колбу *(A).* Для жидкостей, кипящих при температуре ниже 150 °C, применяют охлаждение циркулирующей водой. Колбу нагревают таким образом, чтобы быстро достичь кипения, и отмечают температуру, при которой в цилиндр поступают первые капли отгона. Устанавливают нагревание, которое обеспечивает перегонку от 2 до 3 мл в минуту и отмечают температуру, при которой

вся жидкость или некоторая ее фракция, объем которой измеряют при температуре 20°С, отогнаны. Отгон собирают в цилинд вместимостью 50 мл с ценой деления 1 мл.

Вносят поправку в наблюдаемую температуру для приведения к нормальному давлению по формуле:

$$t_1 = t_2 + k(101{,}3 - b),$$

где:
t_1 – исправленная температура, в градусах Цельсия;
t_2 – наблюдаемая температура при давлении b, в градусах Цельсия;
k – поправочный коэффициент в соответствии с Таблицей 2.2.11.-1;
b – барометрическое давление во время перегонки, в килопаскалях.

Таблица 2.2.11.-1.

Коэффициент поправки для приведения к нормальному давлению

Температура перегонки	Коэффициент поправки *k*
До 100°С	0,30
от 100 °С до 140 °С	0,34
от 140 °С до 190 °С	0,38
от 190 °С до 240 °С	0,41
свыше 240 °С	0,45

2.2.12. ТЕМПЕРАТУРА КИПЕНИЯ

Точкой кипения называется скорректированная температура, при которой давление паров жидкости равно 101,3 кПа.

Прибор. В данном случае используется прибор, что и для определения пределов перегонки, за исключением того, что термометр вводится в горло колбы таким образом, чтобы нижний конец ртутной части термометра был на уровне нижнего конца горла перегонной колбы и, чтобы сама колба располагалась на пластине из изолирующего материала со сквозными отверстиями 35 мм.

Методика. 20,0 мл испытуемой жидкости и несколько кусочков пористого материала помещают в колбу *(А).* Нагревают колбу таким образом, чтобы быстро наступило кипение, и записывают температуру, при которой жидкость начинает вытекать из бокового отвода в конденсатор.

Вносят поправку в наблюдаемую температуру для приведения к нормальному давлению по формуле:

$$t_1 = t_2 + k(101{,}3 - b),$$

где:
t_1 – исправленная температура, в градусах Цельсия;
t_2 - наблюдаемая температура при давлении b, в градусах Цельсия;
k – поправочный коэффициент в соответствии с Табл.2.2.11.-1;
b – барометрическое давление во время перегонки, в килопаскалях.

2.2.13. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВОДЫ МЕТОДОМ ОТГОНКИ

Прибор (Рис.2.2.13.-1) состоит из стеклянной круглодонной колбы *(А)*, соединенной трубкой *(D)* с цилиндричной трубкой *(В)*, снабженной градуированным приемником *(Е)* и обратным холодильником *(С).* Цена деления приемника *(Е)* 0.1 мл. Для соответствующего нагревания целесообразно использовать электрический нагреватель с реостатом или масляную (# песчаную) баню. Верхняя часть колбы и соединительная трубка могут быть покрыты теплоизоляцией.

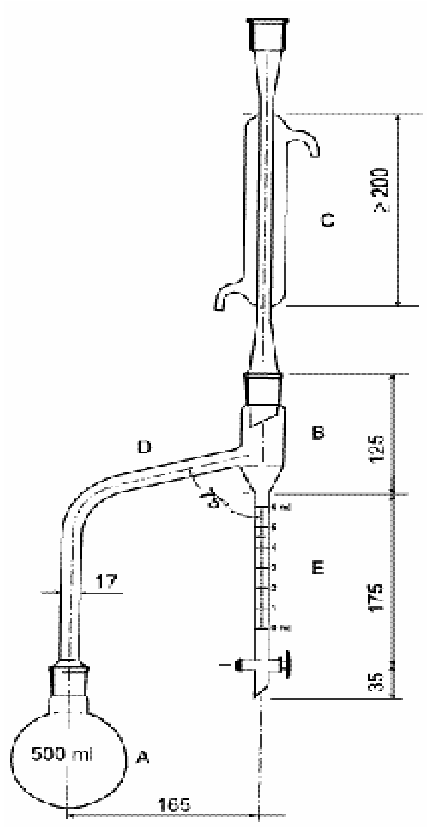


Рисунок 2.2.13.-1. *Прибор для определения воды методом отгона.*
Размеры представлены в миллиметрах.

Методика. Приемник и холодильник прибора очищают, промывают водой и высушивают.

200 мл *толуола Р* и около 2 мл *воды Р* помещают в сухую колбу и отгоняют в течение 2 часов. Колбу оставляют для охлаждения в течение 30 мин и записывают объем воды с точностью до 0,05 мл. В колбу помещают количество вещества, отвешенного с точностью до 1%, которое содержит приблизительно от 2 до 3 мл воды. Если вещество имеет пастоподобную консистенцию, его взвешивают на кусочке металической фольги. В колбу вносят несколько кусочков пористого материала и осторожно нагревают в течение 15 мин. Когда толуол начнет кипеть, отгоняют со скоростью около двух капель в секунду, пока большая часть воды не отгонится, а затем увеличивают скорость отгонки до четырех капель в секунду.

Кипячение прекращают, когда объем воды в приемнике перестанет увеличиваться и верхний слой растворителя в приемнике станет прозрачным.

Когда вода отгонится полностью, внутреннюю трубку холодильника промывают *толуолом Р*. Нагревание продолжают еще 5 мин, затем нагреватель убирают, дают приемнику охладиться до комнатной температуры и стряхивают все капли воды, которые находятся на стенках приемника. После полного разделения воды и толуола записывают объем воды и определяют ее процентное содержание в веществе по формуле:

$$\frac{100(n_2 - n_1)}{m},$$

где:
m – масса испытуемого вещества, в граммах;
n_1 – объем воды, определенный при первом отгоне, в миллилитрах;
n_2 – общий объем отогнанной воды, определенный в обоих отгонах, в миллилитрах;

2.2.14. ТЕМПЕРАТУРА ПЛАВЛЕНИЯ – КАПИЛЛЯРНЫЙ МЕТОД

Температура плавления, определенная капиллярным методом, представляет собой температуру, при которой последняя твердая частичка уплотненного столбика вещества в капиллярной трубке переходит в жидкую фазу.

Весь процесс плавления протекает в течение определенного промежутка времени и определенного интервала температур: начало плавления – появление первой капли жидкости и конец плавления (температура плавления) – полный переходо вещества в жидкое состояние. Этот интервал температур, не должен превышать 2^{o}C, если нет других указаний в частной статье.

Целый ряд органических соединений при плавлении разлагается (происходит резкое изменение внешнего вида вещества, например вспенивание). Такую температуру называют температурой разложения. Она в значительной мере зависит от скорости нагрева, поэтому при определении температуры разложения в частных статьях указывают скорость нагрева.

Капиллярный метод применяют для определения температуры плавления твердых веществ, легко превращаемых в порошок.

Если нет других указаний в частной статье, тот же прибор и методику применяют для определения других показателей, таких как образование мениска, диапазона плавления или температуры разложения, характеризующих поведение вещества при плавлении.

Прибор. Составными частями прибора являются:

- стеклянный сосуд (# круглодонная колба из термостойкого стекла емкостью 100-150 мл, длина горла – 20 см и диаметр горла – 3-4 см), содержащий жидкость (например, воду, вазелиновое или силиконовое масло), используемый в качестве бани и оснащенный подходящим устройством для нагрева;
- # пробирка из термостойкого стекла, вставленная в стеклянный сосуд (колбу) и отстоящая от дна сосуда (колбы) на расстоянии 1 см; диаметр пробирки – 2-2,5 см.
- устройство для перемешивания, обеспечивающее одинаковую температуру внутри бани;
- термометр с меткой погружения и ценой деления не более 0,5^{o}C. Разность между верхним и нижним делениями термометра в области измеряемой температуры – не более 100^{o}C;
- запаянные с одного конца капиллярные трубки из безщелочного прочного стекла, диаметром от 0,9 мм до 1,1 мм и толщиной стенок от 0,10 мм до 0,15 мм.

Во время определения температуры плавления ни колба, ни пробирка не должны быть закрыты герметически.

Методика. Если нет других указаний в частной статье, тонкоизмельченное в порошок вещество сушат в *вакууме (статья2.2.32., способ b)* над *силикагелем безводным Р* в течение 24 часов. Достаточное количество вещества помещают в капиллярную трубку до получения уплотненного столбика высотой от 4 мм до 6 мм. Необходимое уплотнение вещества при заполнении капиллярной трубки можно получить, если ее несколько раз бросить запаянным концом вниз в стеклянную трубку длиной не мене 1,0 метра, поставленную вертикально на твердую поверхность. # Во внутреннюю пробирку прибора помещают термометр так, чтобы конец его отстоял от дна пробирки на 1 см.

Повышают температуру бани приблизительно на 10^{o}C ниже предполагаемой температуры плавления и затем продолжают нагревание со скоростью около 1^{o}C в минуту. Когда температура достигнет значения на 5^{o}C ниже предполагаемой температуры плавления, помещают капиллярную трубку с веществом в прибор, # опуская ее на нитке или другим каким-либо способом, например, быстро вынув термометр, прикрепляют к нему капилярную трубку с веществом с помощью резинового колечка или тонкой проволоки и снова вносят в прибор. Нагревание регулируют так, чтобы к моменту плавления была достигнута необходимая скорость подъема температуры для веществ, устойчивых при нагревании:

0,5–1^{o} в минуту – при определении температуры плавления ниже 100^{o}C;

1–1,5^{o} в минуту – при определении температуры плавления от 100^{o}C до 150^{o}C;

1,5–2° в минуту – при определении температуры плавления выше 150°C,

для веществ, неустойчивых при нагревании – от 2,5°C до 3,5°C в минуту. При использовании прибора, описанного выше, капиллярную трубку погружают в баню так, чтобы ее запаянный конец находился на уровне центра шарика термометра, метка погружения которого находится на уровне поверхности жидкости. Отмечают температуру, при которой последняя твердая частичка перейдет в жидкую фазу.

Проводят не менее двух определений. За температуру плавления принимают среднее значение. Расхождение между определениями не должно превышать 1°C.

Градуировка прибора. Для градуировки прибора используют подходящие вещества, пригодные для этих целей.

Допускается применение других приборов, использующих капиллярный метод, если показано, что точность и правильность измерений будут не хуже, чем в случае применения прибора, описанного выше.

2.2.15. ТЕМПЕРАТУРА ПЛАВЛЕНИЯ – ОТКРЫТЫЙ КАПИЛЛЯРНЫЙ МЕТОД

Для некоторых веществ определяют температуру разжижения, называемую обычно температурой плавления.

Открытый капиллярный метод применяют для веществ, имеющих аморфную структуру, не растирающихся в порошок и плавящихся ниже температуры кипения воды, таких как жиры, воск, парафин, вазелин, смолы.

Определение проводят следующим методом.

Используют стеклянную капиллярную трубку, открытую с обоих концов, длиной около 80 мм, наружным диаметром от 1,4 мм до 1,5 мм и внутренним диаметром от 1,0 мм до 1,2 мм.

Вещество, предварительно обработанное, как указано в частной статье, помещают в каждую из пяти капиллярных трубок (# капиллярную трубку, открытую с обоих сторон, погружают в вещество так, чтобы оно заполнило нижнюю часть трубки) в количестве, достаточном для формирования в каждой трубке столбика высотой около 10 мм. Трубки оставляют на определенное время при температуре, указанной в частной статье.

Прикрепляют одну из капиллярных трубок к термометру с ценой деления 0.2°C таким образом, чтобы вещество находилось в непосредственной близости к шарику термометра.

Термометр с прикрепленной капиллярной трубкой помещают в стакан таким образом, чтобы расстояние между дном стакана и нижней частью шарика термометра составляло 1 см. Стакан наполняют водой таким образом, чтобы высота слоя составляла 5 см. Повышают температуру воды со скоростью 1°C в минуту.

За температуру плавления принимают температуру, при которой вещество начинает подниматься по капиллярной трубке. В тех случаях, когда столбик вещества не поднимается в капилляре, за температуру плавления принимают температуру, при которой столбик вещества в капилляре становится прозрачным.

Повторяют эту операцию с четырьмя другими капиллярными трубками и рассчитывают результат как среднее из пяти показаний.

2.2.16. ТЕМПЕРАТУРА ПЛАВЛЕНИЯ – МЕТОД МГНОВЕННОГО ПЛАВЛЕНИЯ

Метод мгновенного плавления применяют для твердых веществ, легко превращаемых в порошок.

Температуру плавления по этому методу рассчитывают по формуле:

$$\frac{t_1 + t_2}{2},$$

где:

t_1 – первая температура;

t_2 – вторая температура, определяемая в условиях, приведенных ниже.

Прибор. Прибор состоит из металлического блока, изготовленного из материала, обладающего высокой теплопроводностью и не взаимодействующего с испытуемым веществом, например, из латуни. Верхняя поверхность блока должна быть плоской и тщательно отполированной. Блок равномерно нагревают по всей массе газовой горелкой с микрорегулировкой или электрическим нагревателем с тонкой регулировкой. Блок имеет достаточно широкую цилиндрическую полость для размещения термометра, столбик ртути которого должен находиться в одном и том же положении как при калибровке, так и при определении температуры плавления испытуемого вещества. Цилиндрическая полость размещена параллельно отполированной верхней поверхности блока и на расстоянии около 3 мм от нее. Прибор калибруют, используя подходящие вещества с известной температурой плавления.

Методика. Блок быстро нагревают до температуры на 10°С ниже предполагаемой температуры плавления и затем устанавливают скорость нагревания около 1°С в минуту. Несколько частиц тонкоизмельченного в порошок вещества, высушенного в *вакууме (2.2.32., способ b)* над *силикагелем безводным Р* в течение 24 часов, бросают через равные промежутки времени на поверхность блока в непосредственной близости от шарика термометра, очищая поверхность после каждого испытания. Записывают температуру t_1, при которой вещество плавится мгновенно при соприкосновении с металлом. Останавливают нагревание. Во время охлаждения через равные промежутки времени бросают несколько частичек вещества на поверхность блока, очищая ее после каждого испытания. Записывают температуру t_2, при которой вещество прекращает мгновенно плавиться при соприкосновении с металлом.

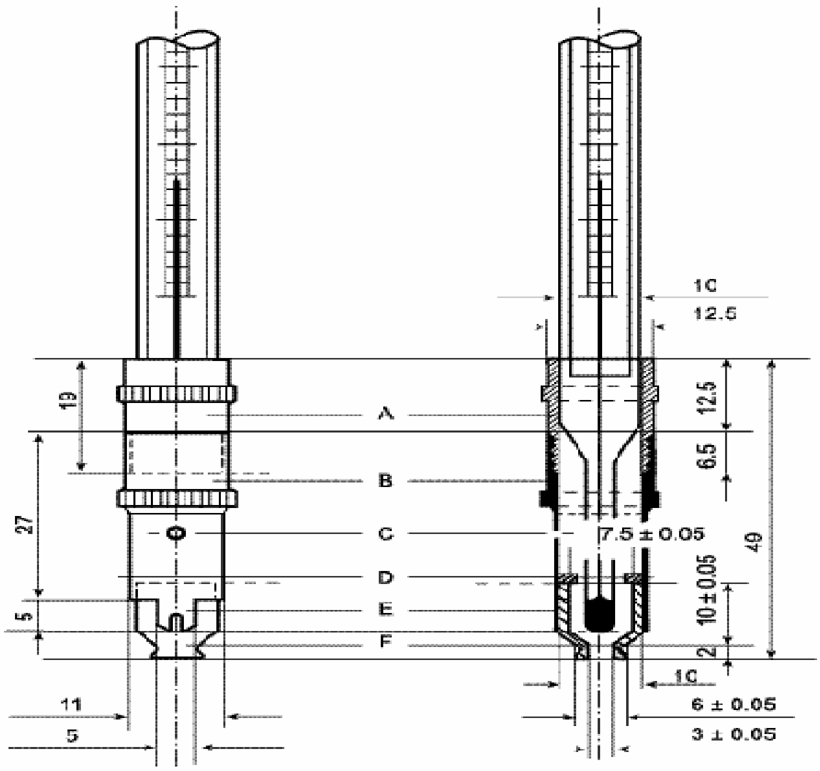
Градуировка прибора. Для градуировки прибора используют подходящие вещества, пригодные для этих целей.

2.2.17. ТЕМПЕРАТУРА КАПЛЕПАДЕНИЯ

Температура каплепадения представляет собой температуру, при которой в условиях, приведенных ниже, первая капля расплавленного испытуемого вещества падает из чашечки.

Определение температуры каплепадения проводят для веществ, не растирающихся в порошок и плавящихся ниже температуры кипения воды, таких как жиры, воск, парафин, вазелин, смолы.

Прибор. Прибор, представленный на Рис. 2.2.17.-1, состоит из двух металлических гильз *(А)* и *(В)*, соединенных одна с другой посредством резьбы. Гильза (А) прикреплена к ртутному термометру.



температуры каплепадения.
Размеры представлены в миллиметрах.

В нижней части гильзы *(В)* с помощью двух уплотнителей *(Е)* свободно закреплена металлическая чашечка *(F).* Точное положение чашечки определяется фиксаторами *(D)* длиной 2 мм, которые используются также для центровки термометра. Отверстие *(С)* в стенке гильзы *(В)* предназначено для выравнивания давления. Отводящая поверхность чашечки должна быть плоской, а края выходного отверстия – под прямым углом к поверхности. Нижняя часть ртутного термометра имеет форму и размер, как показано на рисунке; термометр градуирован от 0°С до 110°С. Расстояние на шкале в 1 мм соответствует разности температур в 1°С. Ртутный шарик термометра имеет диаметр (3,5±0,2) мм и высоту (6,0±0,3) мм.

Прибор устанавливают по оси пробирки длиной около 200 мм и наружным диаметром около 40 мм.

Прибор прикрепляют к пробирке с помощью пробки, в которую вставлен термометр и которая имеет боковую прорезь. Отверстие чашечки должно находиться на расстоянии около 15 мм от дна пробирки. Все устройство погружают в стакан вместимостью около 1 л, заполненный водой. Дно пробирки должно находиться на расстоянии около 25 мм от дна стакана. Уровень воды должен достигать верхней части гильзы *(А).* Для равномерного распределения температуры в стакане используют мешалку.

Методика. Заполняют чашечку до краев нерасплавленным испытуемым веществом, если нет других указаний в частной статье. Избыток вещества удаляют с обеих сторон шпателем. После того как гильзы *(А)* и *(В)* соединены, проталкивают чашечку внутрь на ее место в гильзе *(В)* до упора. Удаляют шпателем вещество, выдавленное термометром. Прибор помещают в водяную баню, как описано выше. Водяную баню нагревают до температуры примерно на 10°С ниже предполагаемой температуры каплепадения и устанавливают скорость нагрева около 1°С в минуту. Отмечают температуру падения первой капли. Проводят не менее трех определений, каждый раз с новым образцом вещества. Разность между показаниями не должна превышать 3°С. Среднее из полученных значений представляет собой температуру каплепадения.

2.2.18. ТЕМПЕРАТУРА ЗАТВЕРДЕВАНИЯ

Температура затвердевания представляет собой максимальную температуру, при которой происходит затвердевание переохлажденной жидкости.

Прибор. Прибор (Рис. 2.2.18.-1) состоит из пробирки для проведения определения диаметром около 25 мм и длиной около 150 мм, помещенной во внутрь другой пробирки диаметром около 40 мм и длиной около 160 мм. Внутренняя пробирка закрыта пробкой, снабженной термометром длиной около 175 мм с ценой деления 0.2^{o}C, который закреплен таким образом, чтобы ртутный шарик находился на уровне около 15 мм от дна пробирки. В пробке имеется отверстие, через которое проходит вал мешалки, изготовленный из стеклянного стержня или другого подходящего материала, загнутый на конце под прямым углом в виде петли, внешний диаметр которой около 18 мм. Внутреннюю пробирку вместе с внешней пробиркой размещают в центре сосуда вместимостью 1 л, в который помещают подходящую охлаждающую жидкость, уровень которой находится в пределах 20 мм от верхнего края сосуда. Охлаждающая баня также должна быть снабжена термометром.

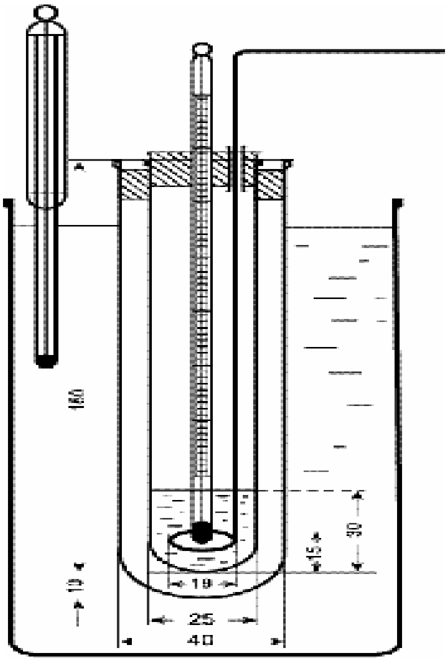


Рисунок 2.2.18.-1. *Прибор для определения температуры затвердевания. Размеры представлены в миллиметрах.*

Методика. Во внутреннюю пробирку помещают достаточное количество жидкости или предварительно расплавленного вещества, чтобы покрыть ртутный шарик термометра (ртутный шарик термометра должен находиться посередине слоя испытуемого вещества), и при быстром охлаждении определяют приблизительную температуру затвердевания. Внутреннюю пробирку помещают в водяную баню с температурой на 5^{o}C выше приблизительно определенной температуры до полного расплавления кристаллов. Затем заполняют сосуд водой или насыщенным раствором натрия хлорида с температурой на 5^{o}C ниже ожидаемой температуры затвердевания. Внутреннюю пробирку вместе с внешней помещают в сосуд, тщательно перемешивают испытуемое вещество до начала появления кристаллов, # отмечая температуру каждые 30 секунд, и выдерживают до полного затвердевания. Вначале происходит постепенное понижение температуры, затем, при появлении твердой фазы, она остается некоторое время постоянной или повышается перед тем, как стать постоянной (в этот момент прекращают перемешивание), а затем снова падает. Отмечают наиболее высокую температуру, остающуюся короткое время постоянной с начала затвердевания

вещества. Эту температуру и принимают за температуру затвердевания. Если вещество остается жидким при ожидаемой температуре затвердевания, его затвердевание вызывают потиранием о стенки внутренней пробирки термометром или внесением кристаллика испытуемого вещества.

2.2.19. АМПЕРОМЕТРИЧЕСКОЕ ТИТРОВАНИЕ

При амперометрическом титровании конечную точку титрования пределяют по изменению тока между погруженными в испытуемый раствор электродами (один из них поляризущийся индикаторный, а другой неполяризующийся электрод сравнения, либо два поляризующихся индикаторных электрода) как функции от количества прибавленного титранта при постоянной и контролируемой разности потенциалов. Потенциал индикаторного электрода должен обеспечивать предельный диффузионный ток для электрохимически активного соединения.

Прибор. Прибор состоит из источника постоянного тока с регулируемым напряжением и чувствительного микроамперметра. Детектирующая система обычно состоит из индикаторного электрода (например, платинового, ртутного капельного, вращающегося дискового или графитового электрода) и электрода сравнения (например, каломельного или хлоридсеребряного электрода).

Иногда используют трехэлектродную систему, состоящую из индикаторного электрода, электрода сравнения и поляризованного вспомогательного электрода.

Методика. Электроды помещают в испытуемый раствор, устанавливают постоянный потенциал, указанный в частной статье, и прибавляют титрант порциями. По значениям силы начального тока и значениям, полученным в процессе титрования, строят график зависимости силы тока от количества прибавляемого титранта. Титрант прибавляют последовательно, не менее чем тремя порциями, составляющими в сумме около 80% от теоретического объема, соответствующего предполагаемой точке эквивалентности. Три полученных значения силы тока должны укладываться на прямую. Продолжают последовательно прибавлять титрант после предполагаемой точки эквивалентности не менее трех раз. Полученные значения должны укладываться на прямую. Точка пересечения этих двух прямых представляет конечную точку титрования.

При амперометрическом титровании с двумя индикаторными электродами (без электрода сравнения) оба электрода изготовлены из одного и того же материала и имеют одинаковую относительно небольшую поверхность. В этом случае регистрируют всю кривую титрования и определяют конечную точку титрования по минимальному значению силы тока. Наибольшая точность амперометрического титрования достигается при потенциале на индикаторном электроде, соответствующем предельному диффузионному току.

При амперометрическом титровании, как правило, концентрация титранта в 10-20 раз превышает концентрацию определяемого вещества.

В фармакопейном анализе амперометрическое титрование целесообразно применять в нитритометрии, при определении воды полумикрометодом (по К. Фишеру) и в йодометрии.

В частных статьях необходимо указывать параметры, необходимые для корректного выполнения методики, например: типы электродов, задаваемый потенциал, массу навески вещества, концентрацию титранта, температуру и т.д.

2.2.20. ПОТЕНЦИОМЕТРИЧЕСКОЕ ТИТРОВАНИЕ

При потенциометрическом титровании конечную точку титрования находят, измеряя электродвижущую силу (э.д.с.) электродной пары, состоящей из индикаторного электрода и электрода сравнения или двух индикаторных электродов, погруженных в испытуемый раствор, как функцию количества прибавленного титранта.

Э.д.с. обычно измеряют при нулевом или практически нулевом токе.

Потенциометрическое титрование обычно дает более точные результаты, чем индикаторное, особенно при анализе мутных и окрашенных растворов, позволяет автоматизировать процесс титрования.

Как правило, электродную пару погружают в испытуемый раствор, кроме случаев, когда ионы из электрода сравнения мешают титрованию. В этом случае электрод сравнения соединяют с испытуемым раствором электролитическим мостом.

Прибор. Используемый прибор (простой потенциометр, электронное устройство, # pH-метр, иономер) включает вольтметр с разрешением около милливольта.

Потенциометрическое титрование применяют для анализа, основанного на следующих типах реакций: кислотно-основных, осаждения, комплексообразования, окисления-восстановления.

Выбор индикаторного электрода зависит от природы определяемого вещества # и типа аналитической реакции. Этот электрод может быть стеклянным или металлическим (например, платиновым, золотым, серебряным или ртутным).

Индикаторный электрод выбирают так, чтобы его потенциал закономерно изменялся при протекании химической реакции между титруемыми ионами и ионами титранта (Табл. 2.2.20.-1). Электродом сравнения обычно служит каломельный или хлоридсеребряный электрод.

Для кислотно-основного титрования, если нет других указаний в частной статье, используют систему стеклянного и хлоридсеребряного электродов.

Таблица 2.2.20.-1

Электродные системы для потенциометрического титрования

Тип аналитической реакции	Индикаторные электроды	Электроды сравнения	Применение
Кислотно-основной	Стеклянный	Хлоридсеребряный, каломельный	Титрование кислот, оснований и солей
Осаждения	Серебряный, сульфид-серебряный	Хлоридсеребряный, каломельный, стеклянный	Титрование галогенидов, роданидов, цианидов, сульфидов
Комплексоно-метрический	Ртутный, ионоселективный	Хлоридсеребряный, каломельный, стеклянный	Титрование катионов, образующих прочные комплексонаты
Окислительно-восстано-вительный	Платиновый	Хлоридсеребряный, каломельный, стеклянный	Титрование восстановителей различными окислителями, например, броматом, дихроматом, перманганатом, йодом, и церием (IУ). Титрование окислителей различными восстановителями, например, арсенитом, тиосульфатом и нитритом

Методика. Строят график зависимости изменения э.д.с. от количества прибавленного титранта, продолжая прибавлять титрант сверх предполагаемой точки эквивалентности. Конечная точка титрования соответствует резкому изменению э.д.с.

При проведении анализа титрованный раствор прибавляют из бюретки равными объемами при постоянном перемешивании. Вблизи точки эквивалентности прибавляют по 0,1 или 0,05 мл и после каждого прибавления измеряют э.д.с. Измерение э.д.с., возникающей за счет разности потенциалов между индикаторным электродом и электродом сравнения осуществляется с помощью высокоомных потенциометров (pH-метров). Величина э.д.с. особенно сильно изменяется вблизи точки эквивалентности, абсолютное значение отношения изменения э.д.с. (ΔE) к приросту объема прибавляемого титранта (ΔV) в этой точке будет максимальным.

Объем титранта в точке эквивалентности $V_{экв}$ может быть определен следующими способами:

1. по графику кривой титрования в координатах [V, *E*], применяя метод касательных;

2. по графику:

$$[V; \frac{\Delta E}{\Delta V}],$$

где:

Δ*E – изменение э.д.с.;*

ΔV – соответствующее приращение объема титранта.

При этом конечной точке титрования соответствует максимальное значение *ΔE*/ΔV;

3. расчетным путем по максимальному значению *ΔE*/ΔV и соответственно *Δ(ΔE*/ΔV), как указано в таблице 22.20-2 и формуле расчета. Эквивалентный объем титранта $V_{экв}$ рассчитывают по формуле:

$$V_{экв} = V_1 + (V_2 - V_1)\frac{A_{V_1}}{A_{V_1} - A_{V_2}},$$

где:

V_1 – объем титранта, соответствующий последнему положительному (отрицательному) значению величины A_V;

V_2 - объем титранта, соответствующий первому отрицательному (положительному) значению величины A_V;

A_V = *Δ(ΔE*/ΔV) – приращенная величина *ΔE*/ΔV.

При прохождении через точку эквивалентности A_V меняет знак на противоположный.

Таблица 2.2.20-2.

V_1, *мл*	**ΔV**	***E, mB***	***ΔE***	***ΔE*/ΔV**	**A_V = *Δ(ΔE*/ΔV)**
5.00		250			
	0,1		13	130	
5.10		263			+150
	0,1		28	280	
5.20		291			+720
	0,1		100	1000	
5.30		391			-450
	0,1		55	550	
5.40		446			-330
	0,1		22	220	
5.50		468			-120
	0,1		10	100	
5.60		478			

Пример:

$$V_{экв} = 5{,}20 + (5{,}30 - 5{,}20)\frac{720}{720 - (-450)} = 5{,}26\,мл$$

Потенциометрическое титрование может быть автоматизировано путем применения приборов двух типов: использующих математический анализ кривой титрования или прекращающих прибавление титранта при достижении э.д.с. электронной пары, соответствующей точке эквивалентности.

2.2.21. ФЛУОРИМЕТРИЯ

Флуориметрия – метод анализа, основанный на измерении интенсивности флуоресценции, излучаемой испытуемым веществом относительно флуоресценции, излучаемой стандартным веществом.

Методика. Испытуемое вещество растворяют в растворителе или смеси растворителей, указанных в частной статье. Полученный раствор помещают в кювету или камеру флуориметра и облучают возбуждающим светом, имеющим как можно большую монохроматичность при длине волны, указанной в частной статье.

Измеряют интенсивность излучаемого света под углом 90°С относительно возбуждающего света после прохождения сквозь фильтр, пропускающим избирательно свет с длиной волны максимальной флуоресценции. Могут быть использованы и другие типы приборов при условии получения аналогичных результатов.

При проведении количественных определений в прибор помещают растворитель или смесь растворителей, используемых для растворения анализируемого вещества, и устанавливают регистрирующее устройство прибора на нулевое значение. Затем помещают раствор стандартного образца и устанавливают чувствительность прибора таким образом, чтобы отклик показаний был больше 50% от размера шкалы. Если другое регулирование было проведено с изменением ширины щели, повторно устанавливают регистрирующее устройство прибора на нулевое значение и снова измеряют интенсивность флуоресценции раствора стандартного образца. Затем в прибор помещают испытуемый раствор с неизвестной концентрацией и регистрируют показания прибора. Концентрацию (c_x) испытуемого вещества в растворе рассчитывают по формуле:

$$Cx = \frac{IxC_S}{I_S},$$

где:
C_X – концентрация вещества в испытуемом растворе;
C_S – концентрация стандартного образца в растворе;
I_X – интенсивность флуоресценции испытуемого раствора;
I_S – интенсивность флуоресценции раствора стандартного образца.

Если значения интенсивности флуоресценции не строго пропорционыльны значениям концентрации растворов, измерения могут проводиться с использованием градуировочного графика.

В некоторых случаях измерения могут проводиться с использованием зафиксированного стандарта (например, флуоресцирующего стекла или раствора флуоресцирующей жидкости). В таких случаях концентрация испытуемого вещества может определяться с использованием градуировочного графика, построенного в тех же условиях.

2.2.22. АТОМНО-ЭМИССИОННАЯ СПЕКТРОМЕТРИЯ

Атомно-эмиссионная спектрометрия – это метод определения содержания химического элемента в испытуемом образце посредством измерения интенсивности одной из эмиссионных линий атомного пара элемента. Определение проводят при длине волны, соответствующей выбранной эмиссионной линии.

В основе атомно-эмиссионной спектрометрии лежит использование спектров испускания возбужденных атомов определямых элементов. При создании атомного пара в пламени некоторые атомы возбуждаются и переходят на более высокие энергетические уровни. Когда эти атомы возвращаются на нижние (основные) энергетические уровни, то энергия, полученная атомами, испускается (спектр испускания).

Принцип атомно-эмиссионной спектрометрии заключается в следующем: анализируемый раствор распыляется в виде аэрозоля в пламени горелки. При воздействии температуры пламени происходит ряд сложных физических и химических процессов: испарение растворителя из капель аэрозоля, испарение твердых частиц, диссоциация молекул, возбуждение атомов и возникновение характеристического излучения атомов.

Излучение определяемого элемента отделяется от постороннего светофильтра или призмы, попадает на детектор и вызывает фототок, который измеряется с помощью прибора.

Прибор. Главными составляющими частями прибора являются: генератор атомного пара определяемого элемента (плазма, дуга и т.д.), монохроматор и детектор. Если генератором атомного пара является пламя, в качестве растворителя для приготовления испытуемого раствора и растворов сравнения предпочтительно использовать *воду Р*. В качестве растворителей могут также использоваться органические растворители, если они не влияют на стабильность пламени.

Методика. Атомно-эмиссионный спектрометр выводят на режим в соответствии с инструкцией завода-производителя и устанавливают необходимую длину волны. В генератор атомного пара вводят холостой раствор и настраивают регистрирующее устройство на нулевое значение. Вводят раствор сравнения определяемого элемента с наибольшей концентрацией и настраивают прибор так, чтобы получить регистрируемый сигнал в оптимальном диапазоне измерений.

Определение проводят путем сравнения интенсивности эмиссии испытуемого раствора и растворов сравнения с известными концентрациями определяемого элемента методом градуировочного графика (метод 1), или методом стандартных добавок (метод 2).

МЕТОД 1 – МЕТОД ГРАДУИРОВОЧНОГО ГРАФИКА

Испытуемый раствор готовят, как указано в частной статье. Не менее трех растворов сравнения определяемого элемента готовят так, чтобы диапазон концентраций этих растворов включал ожидаемое значение концентраций определяемого элемента в испытуемом растворе. Любые реагенты, используемые при приготовлении испытуемого раствора, прибавляют в холостой раствор и растворы сравнения в таких же количествах, как и в испытуемый раствор.

Испытуемый раствор и каждый раствор сравнения вводят в генератор не менее трех раз и каждый раз регистрируют установившееся показание. После ввода испытуемого и растворов сравнения каждый раз промывают прибор холостым раствором и проверяют, чтобы показания регистрирующего устройства возвращались к начальному значению.

Строят градуировочный график зависимости средних значений эмиссий растворов сравнения от концентрации, по которому определяют концентрацию элемента в испытуемом растворе.

МЕТОД 2 - МЕТОД СТАНДАРТНЫХ ДОБАВОК

Испытуемый раствор готовят, как указано в частной статье. Равные объемы испытуемого раствора помещают не менее чем в три мерные колбы одинакового объема. В две колбы добавляют пропорционально увеличивающиеся объемы эталонного раствора определяемого элемента и доводят содержимое каждой колбы растворителем до метки. При этом значение эмиссии растворов со стандартными добавками (растворов сравнения) должно находиться в линейной области градуировочного графика.

Испытуемый раствор и каждый раствор со стандартной добавкой вводят в генератор не менее трех раз и каждый раз регистрируют установившееся показание. После ввода испытуемого раствора и растворов с добавками каждый раз промывают прибор холостым раствором и проверяют, чтобы показания регистрирующего устройства возвращались к нулевому значению.

Методом наименьших квадратов рассчитывают линейное уравнение градуировочного графика и по нему - концентрацию определяемого элемента в испытуемом растворе.

Допускается определение концентрации с использованием графического метода. Для этого по оси ординат откладывают средние значения эмиссии испытуемого раствора и растворов со стандартными добавками, а по оси абсцисс – концентрации стандартных добавок определяемого элемента. Экстраполируют линию, проходящую через полученные точки, до пересечения с осью абсцисс.

Концентрация определяемого элемента в испытуемом растворе равна расстоянию между полученной точкой и началом координат.

В случае использования техники ввода твердых проб условия проведения определений должны быть указаны в частной статье.

Примечание:

1. Для вычисления уравнений градуировочных графиков рекомендуется как в методе 1, так и в методе 2 использовать метод наименьших квадратов.

2. Последовательность введения испытуемого и растворов сравнения в генератор должна быть указана, при необходимости, в частной статье.

3. В методику атомно-эмиссионного определения рекомендуется включать тест «Проверка пригодности системы». Одним из параметров данного теста является относительное стандартное отклонение значения эмиссионного сигнала, не превышающее по значению величины, указанной в частной статье.

4. В процессе проведения атомно-эмиссионных определений рекомендуется подтверждать неизменность угла наклона линейной рабочей области градуировочного графика.

5. *Реактивы и эталонные растворы*. Вода должна быть деионизированной на ионнообменных смолах и свежеперегнанной непосредственно перед употреблением и должна соответствовать по чистоте *воде Р*. Ниже представлены растворы солей, катионы которых указаны символами элементов, наиболее часто нормируемых в фармацевтическом анализе.

Кальций. 1,001 г *кальция карбоната Р*, высушенного до постоянной массы при температуре 105°С, растворяют в 25 мл *1 М раствора кислоты хлористоводородной* и доводят объем раствора *водой Р* до 1000,0 мл. Раствор кальция содержит 400 мкг ионов Са в 1 мл. Срок годности раствора 1 месяц, хранение при комнатной температуре.

Калий. 1,1440 г *калия хлорида Р*, высушенного до постоянной массы при температуре 130°С, растворяют в небольшом количестве *воды Р* и доводят объем раствора *водой Р* до 1000,0 мл. Раствор калия содержит 600 мкг ионов К в 1 мл. Срок годности раствора 2 месяца. Хранят при комнатной температуре.

Натрий. 0,5084 г *натрия хлорида Р*, высушенного до постоянной массы при температуре 130°С, растворяют в небольшом количестве *воды Р* и доводят объем раствора *водой Р* до 1000,0 мл. Раствор натрия содержит 200 мкг ионов Na в 1 мл. Срок годности раствора 2 месяца. Хранят при комнатной температуре.

Цинк. 2,5 г *цинка Р* растворяют в 20 мл *6 М раствора кислоты хлористоводородной* и доводят объем раствора *водой Р* до 500,0 мл. Раствор цинка содержит 5 мг ионов Zn в 1 мл. Срок годности раствора 2 месяца. Хранят при комнатной температуре.

Свинец. 0,1600 г *свинца нитрата Р* растворяют в 5 мл *кислоты азотной Р* и доводят объем раствора *водой Р* до 1000,0 мл. Раствор свинца содержит 100 мкг ионов Pb в 1 мл. Срок годности раствора 2 месяца. Хранят при комнатной температуре.

Медь. 1,000 г *меди Р* растворяют в небольшом объеме *кислоты азотной Р* и доводят раствором 10 г/л *кислоты азотной Р* до 1000,0 мл. Раствор меди содержит 1 мг ионов Cu в 1 мл. Срок годности раствора 2 месяца. Хранят при комнатной температуре.

Допускается использование других реактивов и эталонных растворов для спектрального анализа, аттестованных компетентным уполномоченным органом или признанным им.

Эталонные, а также приготовленные на их основе растворы сравнения хранят в посуде, позволяющей сохранять концентрацию этих растворов неизменной (например, в посуде из кварца, тефлона и т.д.). Чашки и тигли для озоления проб должны быть изготовлены из кварца.

2.2.23. АТОМНО-АБСОРБЦИОННАЯ СПЕКТРОМЕТРИЯ

Атомно-абсорбционная спектрометрия – это метод определения содержания химического элемента в исследуемом образце посредством измерения поглощения излучения с постоянно заданной длиной волны, соответствующей определяемому элементу.

Принцип атомно-абсорбционной спектрометрии заключается в следующем: резонансное излучение от лампы с полым катодом проходит через пламя, в которое распыляется анализируемый раствор пробы. Излучение попадает на входную щель монохроматора, установленного таким образом, что выделяется из спектра только резонансная линия определяемого элемента, интенсивность которой измеряется фотоэлектрическим способом. Измеряют уменьшение интенсивности резонансной линии вследствие поглощения ее атомами определяемого элемента, принимая интенсивность ослабленной линии за 100%. Величина поглощения резонансного излучения пропорциональна числу атомов, находящихся в поглощаемом слое. Число возбужденных атомов увеличивается с ростом температуры, которая зависит в основном от теплотворной способности создающего пламя газа.

Прибор. Главными составными частями прибора являются: источник излучения, генератор атомного пара определяемого элемента (пламя, печь и др.), монохроматор и детектор.

Способ введения образца зависит от типа используемого генератора. Если генератором атомного пара является пламя, в качестве растворителя для приготовления испытуемого раствора и растворов сравнения предпочтительно использовать *воду Р*. В качестве растворителя могут также использоваться органические растворители, если они не влияют на стабильность пламени. При использовании печи образец может быть введен в генератор в виде раствора в *воде Р* или в органическом растворителе, так же может быть использована техника ввода твердых проб.

Атомный пар может быть получен также вне спектрометра, например, методом холодного пара для определения ртути или гидридным методом. При определении ртути атомный пар, полученный химическими восстановлением, вносится потоком инертного газа в абсорбционную ячейку, расположенную на оптическом пути прибора. В случае использования гидридного метода получают гидрид определяемого элемента, который либо смешивается с газом, питающим горелку, либо вносится инертным газом в нагретую абсорбционную ячейку, где происходит диссоциация гидрида до атомов.

Методика. Атомно-абсорбционный спектрометр выводят на режим в соответствии с инструкцией завода-изготовителя и устанавливают требуемую длину волны. В генератор атомного пара вводят холостой раствор и настраивают регистрирующее устройство на максимальное светопропускание. Вводят раствор сравнения определяемого элемента с наибольшей концентрацией и настраивают прибор так, чтобы получить регистрируемый сигнал в оптимальном диапазоне измерений.

Определения проводят путем сравнения величины поглощения испытуемого раствора и растворов сравнения с известными концентрациями определяемого элемента методом градуировочного графика (метод 1) или методом стандартных добавок (метод 2).

Для определения концентрации элемента в анализируемом образце наряду с методом 1 и методом 2 допускается применение метода сравнения и метода ограничивающих растворов или других валидированных методов.

МЕТОД 1 – МЕТОД ГРАДУИРОВОЧНОГО ГРАФИКА

Испытуемый раствор готовят, как указано в частной статье. Не менее трех растворов сравнения определяемого элемента готовят так, чтобы диапазон концентраций этих растворов включал ожидаемое значение концентраций определяемого элемента в испытуемом растворе. Любые реагенты, используемые в приготовлении испытуемого раствора, прибавляют в холостой раствор и растворы сравнения в таких же количествах, как и в испытуемый раствор.

Испытуемый раствор и каждый раствор сравнения вводят в генератор не менее трех раз, и каждый раз регистрируют установившееся показание. После ввода испытуемого раствора и растворов сравнения каждый раз промывают прибор холостым раствором и проверяют, чтобы показания регистрируещего устройства возвращались к первоначальному значению.

В случае применения печи в качестве генератора атомного пара между измерениями ее отжигают.

Строят градуировочный график зависимости средних значений поглощения растворов сравнения от концентрации и определяют по нему концентрацию элемента.

В случае использования техники ввода твердых проб условия проведения определений должны быть указаны в частной статье.

МЕТОД 2 - МЕТОД СТАНДАРТНЫХ ДОБАВОК

Испытуемый раствор готовят, как указано в частной статье. Равные объемы испытуемого раствора помещают не менее, чем в три мерные колбы одинакового объема. Во все колбы, кроме одной, прибавляют пропорционально увеличивающиеся объемы эталонного раствора определяемого элемента и доводят содержимое каждой колбы растворителем до метки. При этом значение поглощения растворов со стандартными добавками (растворов сравнения) должно находиться в линейной области градуировочного графика.

Испытуемый раствор и каждый раствор со стандартной добавкой вводят в генератор не менее трех раз и каждый раз регистрируют установившееся показание. После ввода испытуемого раствора и растворов с добавками каждый раз промывают прибор холостым раствором и проверяют, чтобы показания регистрирующего устройства возвращались к первоначальному значению.

В случае использования печи в качестве генератора атомного пара между измерениями ее отжигают.

Вычисляют параметры линейного уравнения прямой зависимости средних значений поглощения растворов от концентрации методом наименьших квадратов и рассчитывают концентрацию определяемого элемента в испытуемом растворе.

Допускается определение концентрации с применением графического метода. Для этого по оси ординат откладывают средние значения поглощения испытуемого раствора и растворов со стандартными добавками, а по оси абсцисс – концентрации стандартных добавок определяемого элемента. Экстраполируют линию, проходящую через полученные точки, до пересечения с осью абсцисс. Концентрация определяемого элемента в испытуемом растворе равна расстоянию между полученной точкой и началом координат.

В случае использования техники ввода твердых проб условия проведения должны быть указаны в частной статье.

Для определения концентрации элемента в анализируемом образце наряду с методом 1 и методом 2 допускается использование метода сравнения и метода ограничивающих растворов или других валидированных методов.

Примечание:

1. Для вычисления параметров линейной рабочей области калибровочных кривых рекомендуется как в методе 1, так и в методе 2 использовать метод наименьших квадратов.

2. Последовательность введения испытуемого и растворов сравнения в генератор должна быть указана, при необходимости, в частной статье.

3. В методику атомно-абсорбционного определения рекомендуется включать тест “Проверка пригодности системы”. Одним из параметров данного теста является относительное стандартное отклонение значения атомно-абсорбционного сигнала, не превышающее по значению величины, указанной в частной статье.

4. В процессе проведения атомно-абсорбционных определений рекомендуется подтверждать неизменность угла наклона линейной рабочей области калибровочной кривой.

5. *Реактивы и эталонные растворы*. Вода должна быть деионизированной на ионнообменных смолах и продистиллированной непосредственно перед употреблением и должна соответствовать по чистоте *воде Р*. Ниже приведены растворы солей, катионы которых указаны символами элементов, наиболее часто нормируемых в фармацевтическом анализе.

Кальций. 1,001 г *кальция карбоната Р*, высушенного до постоянной массы при температуре 105^{o}C, растворяют в 25 мл *1 М раствора кислоты хлористоводородной* и доводят объем раствора *водой Р* до 1000,0 мл. Раствор

кальция содержит 400 мкг ионов Ca в 1 мл. Срок годности раствора 1 месяц. Хранят при комнатной температуре.

Калий. 1,1440 г *калия хлорида Р*, высушенного до постоянной массы при температуре 130°С, растворяют в небольшом количестве *воды Р* и доводят объем раствора *водой Р* до 1000.0 мл. Раствор калия содержит 600 мкг ионов K в 1 мл. Срок годности раствора 2 месяца. Хранят при комнатной температуре.

Натрий. 0,5084 г *натрия хлорида Р*, высушенного до постоянной массы при температуре 130°С, растворяют в небольшом количестве *воды Р* и доводят объем раствора *водой Р* до 1000,0 мл. Раствор натрия содержит 200 мкг ионов Na в 1 мл. Срок годности раствора 2 месяца. Хранят при комнатной температуре.

Цинк. 2,5 г *цинка Р* растворяют в 20 мл *6 М раствора кислоты хлористоводородной* и доводят объем раствора *водой Р* до 500,0 мл. Раствор цинка содержит 5 мг ионов Zn в 1 мл. Срок годности раствора 2 месяца. Хранят при комнатной температуре.

Свинец. 0,1600 г *свинца нитрата Р* растворяют в 5 мл *кислоты азотной Р* и доводят объем раствора *водой Р* до 1000,0 мл. Раствор свинца содержит 100 мкг ионов Pb в 1 мл. Срок годности раствора 2 месяца. Хранят при комнатной температуре.

Медь. 1,000 г *меди Р* растворяют в небольшом объеме *кислоты азотной Р* и доводят раствором 10 г/л *кислоты азотной Р* до 1000,0 мл. Раствор меди содержит 1 мг ионов Cu в 1 мл. Срок годности раствора 2 месяца. Хранят при комнатной температуре.

Допускается использование других реактивов и эталонных растворов для спектрального анализа, аттестованных компетентным уполномоченным органом или признанным им.

Эталонные, а также приготовленные на их основе растворы сравнения хранят в посуде, которая позволяет сохранять концентрацию этих растворов неизменной (например, в посуде из кварца, тефлона и т.д.). Чашки и тигли для озоления проб должны быть изготовлены из кварца.

2.2.24. АБСОРБЦИОННАЯ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЯ В ИНФРАКРАСНОЙ ОБЛАСТИ

Спектрофотометрию в инфракрасной области спектра обычно используют для исследования строения молекул, идентификации, количественного определения, а также для контроля примесей в субстанциях.

Инфракрасные спектрофотометры применяют для записи спектров в области 4000 см$^{-1}$ до 670 см$^{-1}$ (от 2.5 мкм до 15 мкм), а в некоторых случаях до 200 см$^{-1}$ (до 50 мкм).

В спектрофотометрах с Фурье-преобразованием используется полихроматическое излучение и рассчитывается спектр в заданной области частот путем Фурье-преобразования исходных данных. Также могут быть использованы спектрофотометры, снабженные оптической системой, способной выделять монохроматическое излучение в измеряемой области. Обычно спектр представляется как функция пропускания, т.е. отношения интенсивности прошедшего к падающему на образец излучению.

Оптическую плотность (*A*) определяют как десятичный логарифм величины обратной пропусканию (*T*):

$$A = \log_{10}(1/T) = \log_{10}(I_0 / I),$$

где:

$T = I : I_0$,

I_0 – интенсивность излучения, падающего на вещество;

I – интенсивность излучения, прошедшего через вещество.

Каждый инфракрасный спектр характеризуется серией полос поглощения, максимумы которых определяются волновым числом ν или длиной волны λ и

интенсивностью максимумов поглощения. Волновое число ν, выраженное в обратных сантиметрах (см$^{-1}$), определяется из соотношения:

$$V = \frac{10^4}{l},$$

где:

l – длина волны в микрометрах (мкм).

ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦА

Для записи пропускания или поглощения исследуемый образец готовят по одной из следующих методик.

Жидкости. Жидкости исследуют в форме пленки, находящейся между двумя пластинками, прозрачными для инфракрасного излучения, или в кювете с соответствующей толщиной слоя, также прозрачной для инфракрасного излучения.

Жидкости или твердые вещества в растворе. Готовят раствор испытуемого образца в подходящем растворителе. Выбирают концентрацию вещества и толщину слоя кюветы, позволяющие получить удовлетворительный спектр. Обычно хорошие результаты получают при концентрациях от 10 г/л до 100 г/л при толщине слоя от 0,5 до 0,1 мм. Поглощение растворителя компенсируют путем помещения в канал сравнения аналогичной кюветы, содержащей выбранный растворитель.

Твердые вещества. Твердые вещества исследуют диспергированными в подходящей жидкости в виде суспензии или в твердом состоянии (диски из галогенидов щелочных металлов). Если указано в частной статье, формируют пленку из расплавленной массы между двумя пластинами, прозрачными для инфракрасного излучения.

а) *Суспензия.* Небольшое количество субстанции, предназначенной для испытания, растирают с минимальным количеством *вазелинового масла Р* или другой подходящей жидкости; обычно от 5 мг до 10 мг субстанции достаточно для получения подходящей суспензии. Полученную суспензию сжимают между двумя пластинками, прозрачными для инфракрасного излучения.

б) *Диски.* От 1 мг до 2 мг образца, предназначенного для испытания, растирают с 300-400 мг, если нет других указаний, тщательно измельченного *калия бромида Р* или *калия хлорида Р*. Обычно этих количеств достаточно для получения диска диаметром 13 мм и спектра соответствующей интенсивности. Смесь тщательно растирают, добиваясь необходимой однородности, и прессуют при давлении около 800 МПа (8т·см$^{-2}$) *в вакууме*. Причиной образования некачественных дисков могут быть такие факторы, как недостаточное или чрезмерное растирание, влажность или иные примеси в дисперсионной среде и недостаточное измельчение частиц.

Диск непригоден для испытания, если он при визуальном осмотре неоднороден по прозрачности или если пропускание 2000 см$^{-1}$ (5 мкм) составляет менее 75% без компенсации при отсутствии специфической полосы поглощения вещества.

Газы. Газы исследуют в кювете, прозрачной для инфракрасного излучения с длиной оптического пути около 100 мм. Кювету откачивают и заполняют через кран или при помощи игольчатого клапана через подходящую газовую линию между кюветой и контейнером с субстанцией, предназначенной для испытания.

Если необходимо, доводят давление в кювете до атмосферного, используя газ, прозрачный для инфракрасного излучения (например, *азот Р* или *аргон Р*). Мешающее влияние поглощения воды, углерода диоксида или других атмосферных газов исключают путем помещения в канал сравнения идентичной кюветы, которая

либо вакуумирована, либо заполнена газом, прозрачным для инфракрасного излучения.

Запись многократного отражения

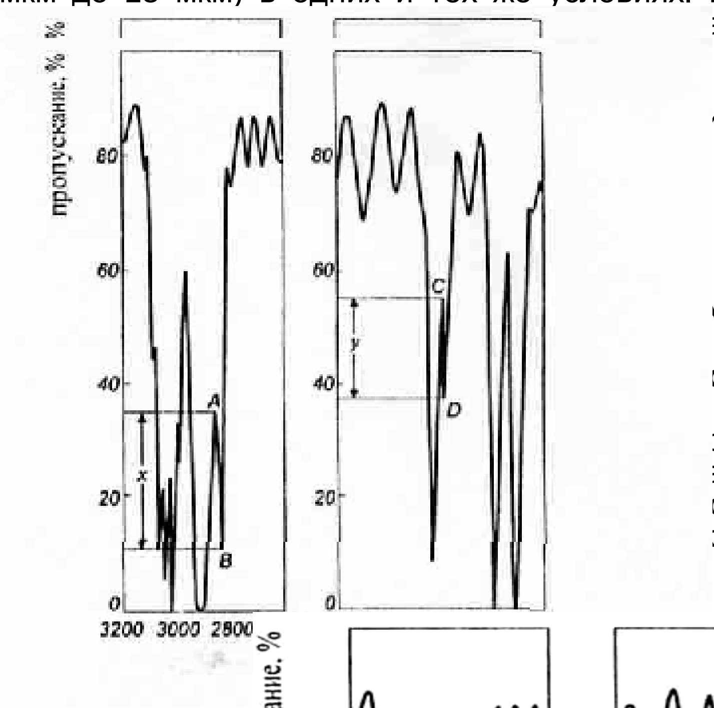
Исследуемый образец готовят по одной из следующих методик.

а) растворяют в подходящем растворителе в условиях, описанных в частной статье. Раствор испаряют на пластинке таллия бромида или на другой подходящей пластинке.

б) помещают на пластинку таллия бромида-иодида или на другую подходящую пластинку таким образом, чтобы получить гомогенный контакт.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СТАНДАРТНЫХ ОБРАЗЦОВ

Образцы испытуемого вещества и стандартного вещества готовят по одной и той же методике и записывают спектры в области от 4000 $см^{-1}$ до 670 $см^{-1}$ (от 2,5 мкм до 15 мкм) в одних и тех же условиях. Минимумы пропускания (максимумы



анции должны соответствовать по
в спектре стандартного образца.
состоянии, показывают различия в
имумов поглощения), то образец
ец обрабатывают одним и тем же
или получались в одной и той же
м в частной статье, а затем снимают

ЛОННЫХ СПЕКТРОВ

сти. Записывают спектр пленки
(см. Рис2.2.24.-1) между процентом
ри 2870 $см^{-1}$ (3.48 мкм) и минимуме
а быть больше 18. Разность *y* между
скания С при 1589 $см^{-1}$ (6.29 мкм) и
:м) должна быть больше 12.

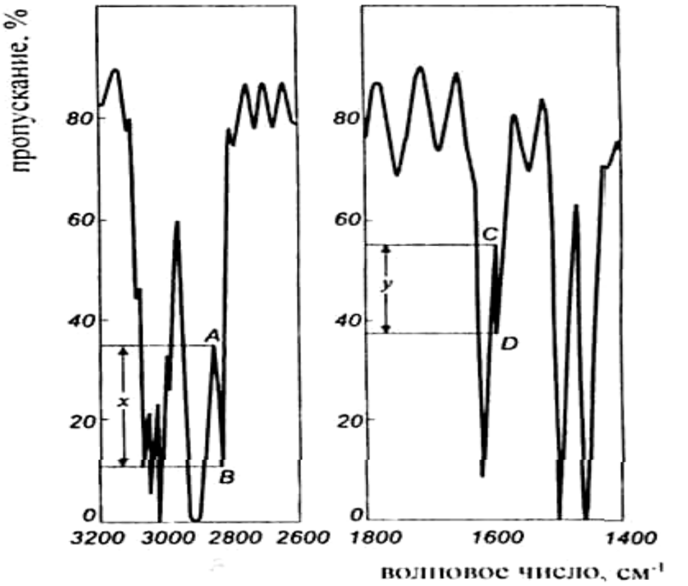


Рисунок 2.2.24.-1. *Типичный спектр полистерола, используемого для проверки разрешающей способности*

Проверка шкалы волновых чисел. Шкала волновых чисел может быть проверена с использованием пленки полистирола, которая имеет минимум пропускания (максимум поглощения) при волновых числах (см$^{-1}$), приведенных в Табл. 2.2.24.-1.

Таблица 2.2.24.-1.

Минимумы пропускания (допустимые пределы) пленки полистирола

3060,0 (±1,5) см$^{-1}$
2849,5 (±1,5) см$^{-1}$
1942,9 (±1,5) см$^{-1}$
1601,2 (±1,0) см$^{-1}$
1583,0 (±1,0) см$^{-1}$
1154,5 (±1,0) см$^{-1}$
1028,3 (±1,0) см$^{-1}$

Для проверки шкалы волновых чисел могут использоваться методики, приведенные в инструкции к прибору.

Методика. Испытуемый образец готовят к испытанию согласно инструкции, приложенной к эталонному спектру. Используя условия, при которых проводилась проверка разрешающей способности, записывают спектр испытуемого образца и поверх него полосы поглощения полистирольной пленки при 2849,5 см$^{-1}$ (3,51 мкм), 1601,2 см$^{-1}$ (6,25 мкм) и 1028,3 см$^{-1}$ (9,72 мкм). Сравнивают два спектра (эталонный и спектр испытуемого образца) и полосы поглощения пленки полистирола, указанные выше. Положения значимых полос в спектре испытуемого образца и эталонном спектре должны соответствовать в пределах 0,5% от шкалы волновых чисел. Относительная величина полос обоих спектров должна согласовываться между собой.

ПРИМЕСИ В ГАЗАХ

Для анализа примесей используют кювету, прозрачную для инфракрасного излучения и имеющую соответствующую длину оптического пути (например, от 1 м до 20 м). Кювету заполняют так, как указано в разделе «Газы». Для определения и количественной оценки примесей используют методики, указанные в частных статьях.

2.2.25. АБСОРБЦИОННАЯ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЯ В УЛЬТРАФИОЛЕТОВОЙ И ВИДИМОЙ ОБЛАСТЯХ

Определение оптической плотности. Оптическая плотность *(A)* раствора представляет собой десятичный логарифм обратной величины пропускания *(T)* для монохроматического излучения и выражается соотношением:

$$A = \log_{10}(1:T) = \log_{10}(I_0 : I)$$

$$T = I : I_0,$$

где:

I_0 – интенсивность падающего монохроматического излучения;

I – интенсивность прошедшего монохроматического излучения.

В отсутствии других физико-химических факторов измеренная оптическая плотность (*A*) пропорциональна длине пути (*b*), через который проходит излучение, и концентрации (*c*) вещества в растворе в соответствии с уравнением:

$$A = e \cdot c \cdot b,$$

где:
e – молярный показатель (коэффициент) погашения;
b – концентрация вещества в растворе, в молях на литр;
c – длина оптического пути, в сантиметрах.

Величина $A_{1см}^{1\%}$ представляет собой удельный показатель поглощения, то есть оптическую плотность раствора вещества с концентрацией 10 г/л в кювете с толщиной слоя 1 см, то есть:

$$A_{1см}^{1\%} = \frac{10 \cdot e}{М.м.}$$

Если нет других указаний в частной статье, измерение оптической плотности проводят при указанной длине волны с использованием кюветы 1 см и при температуре (20±1)°С. Если нет других указаний в частной статье, измерение проводят по сравнению с тем же растворителем или той же смесью растворителей, в которой растворено вещество. Оптическая плотность растворителя, измеренная против воздуха при указанной длине волны, не должна превышать 0,4 и желательно, чтобы она была меньше 0,2. Спектр поглощения представляют таким образом, чтобы оптическая плотность или ее некоторая функция были приведены по оси ординат, а длина волны или некоторая функция от длины волны – по оси абсцисс.

Если в частной статье приводят только одно значение для положения максимума поглощения, то это означает, что полученное значение максимума не должно отличаться от указанного более чем на ±2 нм.

Прибор. Спектрофотометр, предназначенный для измерений в ультрафиолетовой и видимой областях спектра, состоит из оптической системы, выделяющей монохроматическое излучение в области от 200 нм до 800 нм, и устройства для измерения оптической плотности.

Проверка шкалы длин волн. Для проверки шкалы длин волн используют линии водородной или дейтериевой разрядной лампы или линии паров ртути, а также максимумы поглощения *раствора гольмия перхлората Р*, которые представлены в Табл. 2.2.25.-1. Допустимое отклонение составляет ±1 нм для ультрафиолетового и ±3 нм для видимого диапазонов.

Таблица 2.2.25.-1.

Максимумы поглощения (или испускания) для проверки шкалы длин волн

241,15 нм (Ho)	404,66 нм (Hg)
253,7 нм (Hg)	435,83 нм (Hg)
287,15 нм (Ho)	486,0 нм (Dβ)
302,25 нм (Hg)	486,1 нм (Hβ)
313,16 нм (Hg)	536,3 нм (Ho)
334,15 нм (Hg)	546,07 нм (Hg)
361,5 нм (Ho)	576,96 нм (Hg)
365,48 нм (Hg)	579,07 нм (Hg)

Проверка шкалы оптической плотности. Проверяют значения оптических плотностей, используя *раствор калия дихромата Р* при длинах волн, указанных в Табл. 2.2.25.-2. В таблице 2.2.25.-2 приведены точные значения удельного показателя погашения и его допустимые пределы для каждой длины волны.

Для проверки шкалы оптических плотностей используют раствор калия дихромата, приготовленный следующим образом. От 57,0 мг до 63,0 мг (точную навеску) *калия дихромата Р*, предварительно высушенного до постоянной массы при температуре 130°С, растворяют в *0,005 М растворе кислоты серной* и доводят до 1000,0 мл этим же растворителем.

Таблица 2.2.25.-2.

Длина волны, в нанометрах	**Удельный показатель поглощения $A^{1\%}_{1см}$**	**Допустимые пределы $A^{1\%}_{1см}$**
235	124,5	от 122,9 до 126,2
257	144,5	от 142,8 до 146,2
313	48,6	от 47,0 до 50,3
350	107,3	от 105,6 до 109,0

Предельный уровень рассеянного света. Рассеянный свет может быть определен при данной длине волны с использованием соответствующих фильтров или растворов: например, оптическая плотность раствора 12 г/л *калия хлорида Р* в кювете с толщиной слоя 1 см при 200 нм, при использовании *воды Р* в качестве компенсационного раствора, должна быть больше 2.

Разрешающая способность (для качественного анализа). Если указано в частных статьях, то определяют разрешающую способность спектрофотометра следующим образом. Записывают спектр 0,02% (об/об) раствора *толуола Р* в *гексане Р*. Минимально допустимое значение отношения оптической плотности в максимуме поглощения при 269 нм к оптической плотности в минимуме поглощения при 266 нм указывают в частной статье.

Ширина спекральной щели (для количественного анализа). В случае использования спектрофотометра с изменяемой шириной спектральной щели при выбранной длине волны возможны погрешности, связанные с шириной этой щели. Для их исключения ширина спектральной щели должна быть малой по сравнению с полушириной полосы поглощения и в то же время должна быть максимально велика для получения высокого уровня I_o. Таким образом, ширина щели должна быть такой, чтобы дальнейшее ее уменьшение не изменяло величину измеряемой оптической плотности.

Кюветы. Допустимые вариации в толщине слоя используемых кювет должны быть не более $\pm$0,005 см. Кюветы, предназначенные для испытуемого и компенсационного растворов, должны иметь одинаковое пропускание (или оптическую плотность) при заполнении одним и тем же растворителем. В противном случае это различие следует учитывать.

ПРОИЗВОДНАЯ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЯ

В производной спектрофотометрии используется преобразование исходного спектра поглощения (нулевой порядок) в производные спектры первого, второго и более высоких порядков.

Производный спектр первого порядка представляет собой график зависимости градиента кривой поглощения (скорость изменения оптической плотности с длиной волны,d*A*/dλ) от длины волны.

Производный спектр второго порядка представляет собой график зависимости кривизны спектра поглощения от длины волны ($d^2A/d\lambda^2$). Вторая производная при любой длине волны λ связана с концентрацией следующим соотношением

$$\frac{d^2A}{dl^2} = \frac{d^2A^{1\%}_{1cv}}{dl^2}\cdot\frac{c`b}{10} = \frac{d^2e}{dl^2}\cdot c`b,$$

где:
c' – концентрация поглощающего раствора, в граммах на литр.

Прибор. Используют спектрофотометр, отвечающий указанным выше требованиям и оснащенный аналоговым резистентноемкостным дифференцирующим модулем или цифровым дефференциатором, или другими средствами получения производных спектров. Некоторые методы получения производных спектров второго порядка сдвигают их относительно спектра нулевого пордяка, что следует учитывать там, где это необходимо.

Разрешающая способность. Если указано в частных статьях, записывают производный спектр второго порядка для раствора 0,2 г/л *толуола Р* в *метаноле Р*, используя *метанол Р* в качестве компенсационного (сравнения) раствора. На спектре должен присутствовать небольшой отрицательный экстремум, расположенный между двумя большими отрицательными экстремумами при 261 нм и 268 нм, соответственно, как показано на Рис. 2.2.25.-1. Если нет других указаний в частных статьях, отношение А/В (см. Рис.2.2.25.-1) должно быть не менее 0,2.

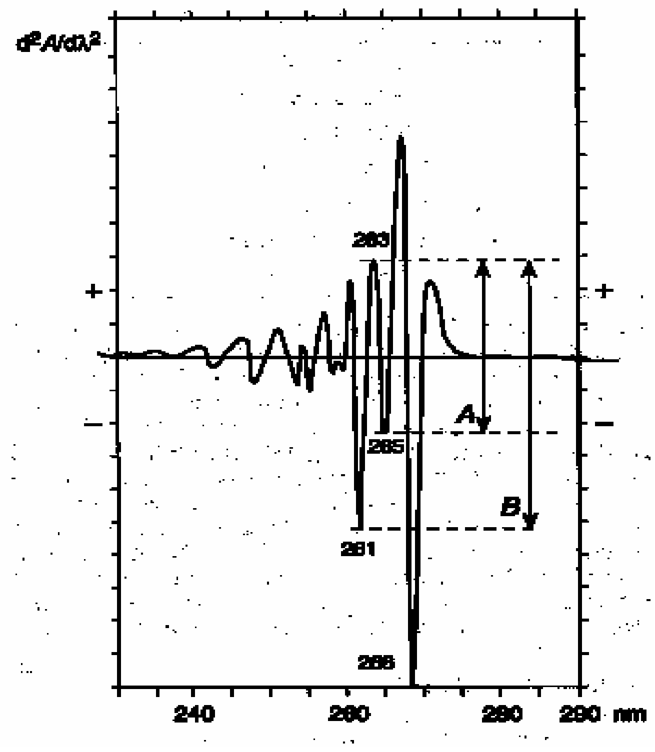


Рис. 2.2.25.-1.

Методика. Готовят раствор испытуемого вещества, устанавливают различные инструментальные характеристики в соответствии с инструкцией к прибору и рассчитывают количество определяемого вещества, как указано в частной статье.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ

Абсорбционную спектрофотометрию в ультрафиолетовой и видимой областях спектра обычно применяют для идентификации лекарственного средства в следующих вариантах:

1. Сравнение спектров поглощения испытуемого раствора и раствора сравнения; в указанной области спектра должно наблюдаться совпадение положений максимумов, минимумов, плечей и точек перегиба.

2. В указанной области спектра при указанных длинах волн должны наблюдаться максимумы, минимумы, плечи и точки перегиба; возможно указание только некоторых из этих характеристик. Расхождение между наблюдаемыми и указанными длинами волн не должно обычно превышать 2 нм.

3. В дополнение к варианту 2 приводят еще и удельные показатели поглощения при указанных длинах волн.

4. В дополнение к варианту 2 приводят отношения оптических плотностей при указанных длинах волн.

Возможны и другие варианты применения, оговоренные в частных статьях.

КОЛИЧЕСТЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Рекомендуется такая схема проведения спектрофотометрических измерений: *“В измерительную кювету помещают испытуемый раствор и определяют его оптическую плотность по сравнению с компенсационным раствором. Затем кювету вынимают, удаляют ее содержимое, снова помещают испытуемый раствор и снова определяют оптическую плотность. Операцию повторяют, получая не менее трех значений оптической плотности для испытуемого раствора. Таким же образом получают не менее трех значений оптической плотности для раствора сравнения. Следует избегать попадания исследуемого раствора на внешнюю стенку кюветы. Для расчетов используют среднее значение полученных оптических плотностей испытуемого раствора и раствора сравнения”.*

1. Однокомпонентный одноволновой анализ. Однокомпонентный одноволновой анализ (или “обычная спектрофотометрия”) – это количественное определение одного из компонентов лекарственного средства посредством измерения оптической плотности раствора испытуемого образца при одной аналитической длине волны (АДВ).

Такой анализ может проводиться методом показателя поглощения (МПП) и методом стандарта (МС).

При использовании МПП количественное определение проводят посредством измерения оптической плотности (А) раствора испытуемого образца при АДВ и расчете концентрации (с) анализируемого компонента по формуле:

$$c = \frac{A}{A_{1см}^{1\%}}, \qquad (1)$$

где:

$A_{1см}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения анализируемого компонента при АДВ;

с – концентрация анализируемого вещества, в процентах (масса/об).

При использовании МС количественное определение проводят посредством измерения при АДВ оптических плотностей раствора испытуемого образца (А) и раствора сравнения (A_o) с концентрацией c_o и расчете концентрации (с) анализируемого компонента, исходя из формулы:

$$\frac{c}{c_0} = \frac{A}{A_0}, \qquad (2)$$

Измерение оптических плотностей испытуемого раствора и раствора сравнения следует проводить в одних и тех же условиях с минимальным интервалом времени.

В общем случае, более надежным является МС. Возможность применения МПП необходимо в каждом конкретном случае обосновывать, исходя из допусков количественного содержания анализируемого компонента, метрологических характеристик методики и требований к спектрофотометру. Обычно МПП применим при допусках содержания анализируемого компонента не менее ±10% от номинального содержания.

Во всех случаях применения одноволнового однокомпонентного анализа необходимо, чтобы остальные компоненты препарата не оказывали существенного влияния на результаты. Обычно доля их суммарного поглощения в оптическом поглощении образца при АДВ не должна превышать десятой части допусков содержания анализируемого компонента.

2. Многокомпонентный спектрофотометрический анализ. Многокомпонентный спектрофотометрический анализ применяют для одновременного количественного определения компонентов лекарственных средств.

В обычной спектрофотометрии погрешность собственно спектрофотометрических измерений (“спектрофотометрическая погрешность”) мало зависит от типа анализируемого вещества и выбора аналитической длины волны, а определяется классом спектрофотометра и не превышает обычно 0.5%. С учетом погрешностей приготовления растворов, это приводит к суммарной погрешности анализа, не превышающей обычно 1%.

В отличие от обычной спектрофотометрии, спектрофотометрическая погрешность многокомпонентного анализа определяется не только классом прибора, но и сильно зависит от состава анализируемого лекарственного средства и особенно выбора аналитических длин волн. Эта погрешность может быть охарактеризована коэффициентом усиления K, который показывает, во сколько раз спектрофотометрическая погрешность определения данного вещества в анализируемой смеси с помощью многокомпонентной спектрофотометрии превышает спектрофотометрическую погрешность определения этого же вещества в чистом растворе (без других компонентов) методом обычной спектрофотометрии. Способы расчета коэффициентов усиления для каждого компонента при использовании различных методов представлены ниже.

Обычными являются величины K=5-10, но возможны и значения K=100 и более, что может приводить к общей погрешности анализа, составляющей десятки и даже сотни процентов.

Для получения надежных результатов при количественном определении лекарственных средств коэффициенты усиления K не должны обычно превышать 5.

Поэтому прогноз погрешности определения и сравнение ее с допусками содержания анализируемого компонента является обязательным условием при обосновании применимости методик многокомпонентной спектрофотометрии. Если нет соответствующего обоснования, то должно выдерживаться следующее соотношение между полной относительной погрешностью количественного определения k_i компонента анализируемого образца ($\Delta_{k,r}$%) и допусками ($\underline{+}B$) содержания этого компонента в образце:

$$\Delta_{k,r} \leq 0{,}32 \cdot B \qquad (3)$$

$$\Delta_{\kappa,r} = 2 \cdot S_{ck,r} \qquad (4)$$

где:

$S_{ck,r}$, - относительное генеральное стандартное отклонение полной погрешности количественного определения k_i компонента анализируемого образца.

Количественное определение в многокомпонентном спектрофотометрическом анализе основывается обычно на использовании уравнения:

$$A_i = \sum_{i=1}^{m} E_{ij} \cdot c_j, \quad i=1 \ldots n, \qquad (5)$$

где:

A_i – оптическая плотность испытуемого раствора при *i*-ой длине волны;

E_{ij} – показатели поглощения (зависящие от способа выражения концентрации) *j*-ого компонента образца при *i*-ой аналитической длине волны;

c_i – концентрация *j*-ого компонента образца.

Для решения данного уравнения могут применяться различные подходы, среди которых можно выделить три основных: метод наименьших квадратов (МНК), модифицированный метод наименьших квадратов (ММНК) и метод отношения рассчитанных концентраций (МОРК).

Метод наименьших квадратов. Метод наименьших квадратов (МНК) является обобщением метода показателя поглощения одноволнового однокомпонентного анализа. В рамках МНК решение уравнения (3) имеет вид:

$$c_к = \sum_{i=1}^{n} a_{ki} \cdot A_i \ , \quad k = 1 \ldots n, \qquad (6)$$

Расчетные коэффициенты $a^{МНК}$ находят в соответствии с матричным соотношением:

$$a^{мнк} = (E^T \cdot E)^{-1} E^T , \qquad (7)$$

где:

$a^{МНК}$ – матрица расчетных коэффициентов;

E – матрица показателей поглощения;

T – символ транспонирования.

Выбор аналитических длин волн (АДВ). Выбор АДВ описан в разделе «Модифицированный метод наименьших квадратов».

Прогноз погрешности определения. Полная погрешность количественного определения k_i компонента с помощью МНК определяется из соотношения:

$$S^2_{ck,r} = (K^{МНК}_k)^2 \cdot (S^2_{A,r} + S^2_{E,r}) + S^2_{V,r} , \qquad (8)$$

$$(K^{МНК}_k)^2 = \sum_{i=1}^{n} \left(\frac{a_{ki} \cdot A^{st}_i}{C^{st}_k}\right)^2 , \qquad (9)$$

где:

$S_{ck,r}$ – относительное стандартное отклонение полной погрешности количественного определения k-ого компонента образца;

A^{st}_i - оптическая плотность раствора модельной смеси образца, содержащей номинальные концентрации всех компонентов;

C^{st}_k – номинальная концентрация k-ого компонента образца в модельной смеси;

$S_{A,r}$ – относительное стандартное отклонение сходимости оптической плотности на спектрофотометре (включая кюветную погрешность);

$S_{E,r}$ – относительное стандартное отклонение правильности оптической плотности на спектрофотометре;

$S_{V,r}$ – относительное стандартное отклонение погрешности приготовления растворов.

Величины $S_{A,r}$ и $S_{E,r}$ известны из паспортных данных спектрофотометра, а $S_{V,r}$ оценивают, исходя из погрешностий взятия навесок и разбавлений.

При этом должны выполняться соотношения (3-4).

Преимуществом МНК является то, что его применение не требует использования стандартных образцов. Однако из-за значительной погрешности правильности оптической плотности (из Табл. 2.2.25.-2 видно, что величины $S_{V,r}$ могут достигать нескольких процентов) и ее неконтролируемости, полная погрешность анализа посредством МНК может достигать десять и более процентов, что деляет МНК ненадежным методом. Его применение предъявляет очень высокие требования к спектрофотометрам и уровню работы аналитического персонала, поэтому он применим обычно только в научных исследованиях на стадии разработки лекарственных средств при больших колебаниях в концентрации анализируемых компонентов.

Модифицированный метод наименьших квадратов. Модифицированный метод наименьших квадратов является одним из вариантов обобщения метода стандарта на случай многокомпонентной спектрофотометрии и основан на уравнениях:

$$d_i = \frac{A_i}{A_i^{st}} = \sum_{j=1}^{m} r_{ij} \cdot \frac{c_i}{c_j^{st}} = \sum_{j=1}^{m} r_{ij} \cdot X_i \quad (10)$$

$$r_{ij} = \frac{E_{ij} \cdot c_j^{st}}{\sum_{k=1}^{m} E_{ik} c_k^{st}}, \quad (11)$$

где переменные имеют тот же смысл, что и в уравнениях (5) и (9), величины r_{ij} представляют собой информационные коэффициенты, а $X_i \cdot 100$ представляет собой концентрацию j-ого компонента препарата в процентах к его номинальному содержанию.

Решение уравнения (10) имеет вид:

$$X_k = \sum_{i=1}^{n} a_{ki}^{ММНК} \cdot d_i, \quad \text{i=1...n}, \quad (12)$$

где расчетные коэффициенты $a^{ММНК}$ находят по матричному уравнению

$$a^{ММНК} = (r^T \cdot r)^{-1} r^T, \quad (13)$$

Выбор аналитических длин волн (АДВ). АДВ находят, исходя из критерия минимума коэффициента усиления $K^{ММНК}$, получаемого из соотношения:

$$(K^{ММНК})^2 = \sum_{j=1}^{m} K_j^2 = \sum_{j-1}^{m} \sum_{i=1}^{n} (a_{ij}^{ММНК})^2, \quad (14)$$

где:

k_i – коэффициент усиления для j-ого компонента образца.

В случае анализа двух соединений по двум длинам волн, АДВ можно находить из условия максимума информационных коэффициентов каждого компонента при одной из двух длин волн.

Схема проведения анализа. Готовят модельную смесь, содержащую все компоненты препарата точно в номинальных концентрациях (раствор сравнения). Проводят необходимые разбавления, измеряют попеременно оптические плотности испытуемого раствора и раствора сравнения при АДВ и проводят расчет по уравнениям (10-11).

Прогноз погрешности определения. Полную погрешность количественного определения k_i компонента с помощью ММНК определяют из соотношения:

$$S^2_{ck,r} = 2 \cdot [(K_k^{ММНК})^2 \cdot S^2_{A,r} + S^2_{V,r}] \quad (15)$$

Должно выполняться соотношение (3).

Недостатком ММНК является необходимость приготовления точной номинальной смеси образца, однако он является самым надежным и точным из всех многоволновых методов количественного определения лекарственных средств.

Частный случай – количественное определение одного компонента смеси по одной длине волны. Если информационный коэффициент (r,k) k_i компонента при i-ой длине волны значительно превосходит все остальные, то количественное определение этого компонента можно проводить по упрощенной формуле:

$$X_k = d_i \quad (16)$$

Максимальная погрешность такого приближенияне превосходит 2B(1- r,k). Данное приближение является обоснованным при r,k ≥ 0.95.

Метод отношения рассчитанных концентраций. Метод отношения рассчитанных концентраций (МОРК) является одним из вариантов обобщения метода стандарта на случай многокомпонентной спектрофотометрии и основан на допущении, что отношение концентраций, рассчитанных для испытуемого раствора и раствора сравнения, является более точным, чем сами рассчитанные концентрации, то есть:

$$X_k = \frac{c_k}{c_k^{st}} = \frac{\sum_{i=1}^{n} a_{ki} \cdot A_i}{\sum_{i=1}^{n} a_{ki} \cdot A_i^{st}}, \quad (17)$$

Здесь a_{ki} – коэффициенты расчетной матрицы, полученные с помощью МНК (уравнение (7)) или другими методами цифровой фильтрации, например, методом производной спектрофотометрии. В отсутствии фона поглощения самым точным является применение МНК.

Выбор аналитических длин волн (АДВ). Смотрите выбор АДВ и ММНК.

Процедура проведения анализа. Такая же как для ММНК, но для изготовления модельной смеси можно использовать концентрации компонентов, близкие (а не точно равные) к номинальным. Расчет концентраций проводят по уравнению (17).

Прогноз погрешности определения (в случае использования МНК) проводят по соотношению:

$$S^2_{ck,r} = 2 \cdot [(K_k^{МНК})^2 \cdot S^2_{A,r} + S^2_{V,r}] \quad (18)$$

Должно выполняться соотношение (3).

МОРК менее точен, чем ММНК, но он не требует приготовления точно номинальной смеси и поэтому проще в применении.

ПРОИЗВОДНАЯ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЯ

Производную спектрофотометрию используют для количественного определения обычно в тех случаях, когда имеется фоновое поглощение, вызванное присутствием веществ, содержание которых не регламентируется. Она может применяться в двух вариантах.

В первом случае получение производной проводит сам аналитик с помощью производных полиномов, которые представляются в уравнении (17) вместо величин a_{ki}. Прогноз погрешности концентрации должен учитывать в этом случае погрешность неполного обращения в нуль поглощения других компонентов смеси.

Во втором случае непосредственно используют значения производных, получаемых на спектрофотометре. Процедура анализа при этом аналогична применению метода стандарта в обычной спектрофотометрии, но вместо оптических плотностей используют производные.

2.2.26. БУМАЖНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Хроматография на бумаге представляет собой хроматографический метод разделения, при котором подвижная жидкая фаза перемещается по капиллярам и поверхности фильтровальной бумаги, либо веществ, предварительно нанесенных на ее волокна. В бумажной хроматографии используют хроматографическую бумагу нужной плотности квалификации «Для хроматографии».

ВОСХОДЯЩАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ НА БУМАГЕ

Оборудование. Представляет собой стеклянную камеру с тщательно пришлифованной крышкой, соответствующую по размерам используемой хроматографической бумаге. Камера в верхней части должна быть снабжена приспособлением для закрепления хроматографической бумаги, с помощью которого ее можно опускать не открывая камеры. На дне камеры помещена емкость (лодочка) для подвижной фазы, в которую должен быть погружен нижний край бумаги. Хроматографическая бумага представляет собой соответствующую фильтровальную бумагу, разрезанную на полоски достаточной длины и шириной не менее 2,5 см; бумага должна быть разрезана так, чтобы подвижная фаза двигалась вдоль направления волокна бумаги.

В некоторых случаях допускается использование хроматографических камер других типов с описанием их в частной статье.

Методика. Обозначенную в частной статье подвижную фазу помещают в лодочку в количестве, достаточном для образования слоя не более 2.5 см. Как указано в частной статье, между стенками камеры и лодочки помещают хроматографическую бумагу. Для насыщения камеру закрывают крышкой и выдерживают обычно 24 часа при температуре от 20°С до 25°С. Поддерживают такую температуру камеры на протяжении всего испытания.

На расстоянии 3 см от одного края по всей ширине полоски бумаги карандашом наносят тонкую горизонтальную линию. Обозначенный в частной статье объем раствора наносят на полученную линию при помощи микропипетки. Если весь обозначенный раствор образует пятно диаметром более 10 мм, раствор наносят небольшими порциями, давая каждому из них высухнуть перед нанесением следующего. Если на одной полоске бумаги должно быть получено больше одной хроматограммы, растворы наносят вдоль линии так, чтобы расстояние между точками нанесения частных проб было не менее 3 см.

Если условия насыщения хроматографической камеры, нанесения пятен или хроматографирования отличаются от условий, описанных выше, они должны быть описаны в частной статье.

Бумагу помещают в камеру, закрывают камеру крышкой и выдерживают 1.5 часа. Бумагу опускают в подвижную фазу и проводят элюирование в соответствии с указанным временем или на указанное растояние, которое должна пройти подвижная фаза. На протяжении всего процесса элюирования бумагу защищают от воздействия прямых солнечных лучей. Полоску бумаги вынимают из камеры и сушат на воздухе.

После прохождения подвижной фазы необходимого расстояния, обозначенного в частной статье, бумагу вынимают, отмечают карандашом конец положения фронта подвижной фазы, сушат и проявляют пятна обозначенным в частной статье способом.

Визуальную оценку, количественное определение, проверку пригодности хроматографической системы, способы оценки определения примесей, контроль специфических примесей, контроль общего содержания примесей проводят в соответствии со статьей *2.2.27 «Тонкослойная хроматография».*

НИСХОДЯЩАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ НА БУМАГЕ

Оборудование. Представляет собой стеклянную камеру с тщательно пришлифованной крышкой, соответствующую по размерам используемой хроматографической бумаге. В центре крышки должно быть отверстие с диаметром около 1,5 см, закрытое тяжелой стеклянной пластиной или пробкой. В верхней части камеры располагается лодочка для подвижной фазы, снабженная приспособлением для закрепления хроматографической бумаги. От каждой стороны лодочки параллельно ей и немного выше верхнего ее края размещены два прямых стеклянных стержня, которые поддерживают бумагу в таком положении, чтобы она не соприкасалась со стенками камеры. Хроматографическая бумага представляет собой соответствующую фильтровальную бумагу, разрезанную на полоски достаточной длины и шириной не менее 2,5 см и не более длины кюветы; бумага должна быть разрезана таким образом, чтобы подвижная фаза двигалась вдоль направления волокна бумаги.

В необходимых случаях допускается использование хроматографических камер других типов с описанием их в частной статье.

Методика. Обозначенную в частной статье подвижную фазу помещают в лодочку в количестве, достаточном для образования слоя не более 2,5 см. Для насыщения камеру закрывают крышкой и выдерживают обычно 24 часа при температуре от 20^{o}C до 25^{o}C. Поддерживают такую температуру камеры на протяжении всего испытания.

По всей ширине полоски бумаги карандашом наносят тонкую горизонтальную линию от закрепленного в лодочке края на таком растоянии, чтобы линия была размещена параллельно стеклянным стержням и несколькими сантиметрами ниже их. Обозначенный в частной статье объем раствора наносят на полученную линию при помощи микропипетки. Если весь обозначенный раствор образует пятно диаметром более 10 мм, раствор наносят небольшими порциями, давая каждому из них высохнуть перед нанесением следующего. Если на одной полоске бумаги должно быть получено больше одной хроматограммы, растворы наносят вдоль линии так, чтобы расстояние между точками нанесения частных проб было не менее 3 см.

Если условия насыщения хроматографической камеры, нанесения пятен или хроматографирования отличаются от условий, описанных выше, они должны быть описаны в частной статье.

Бумагу помещают в камеру, закрывают камеру крышкой и выдерживают 1,5 часа. Через отверстие в крышке в кювету помещают достаточное количество подвижной фазы и проводят элюирование в соответствии с указанным временем или на указанное растояние, которое должна пройти подвижная фаза. На протяжении всего процесса элюирования бумагу защищают от воздействия прямых солнечных лучей.

После прохождения подвижной фазой необходимого расстояния, обозначенного в частной статье, бумагу вынимают, отмечают карандашом конец

положения фронта подвижной фазы, сушат и проявляют пятна обозначенным в частной статье способом.

Визуальную оценку, количественное определение, проверку пригодности хроматографической системы, способы оценки определения примесей, контроль специфических примесей, контроль общего содержания примесей проводят в соответствии со статьей *2.2.27 «Тонкослойная хроматография».*

2.2.27. ТОНКОСЛОЙНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Тонкослойная хроматография (ТСХ) представляет собой метод разделения, в котором используется неподвижная фаза, состоящая из подходящего материала, нанесенного в виде тонкого слоя и зафиксированного на подложке (пластинке) из стекла, металла или пластмассы. Перед хроматографированием растворы анализируемых веществ наносят на пластинку. Разделение основано на процессах адсорбции, распределения, ионного обмена или на их комбинации и осуществляется посредством перемещения в тонком слое (неподвижной фазе) исследуемых веществ, растворенных в растворителе или соответствующей смеси растворителей (подвижной фазе).

ОБОРУДОВАНИЕ

Пластинки. Хроматографирование проводят с использованием пластинок, полученных, как указано в разделе «Реактивы».

Допускается использование пластинок, приготовленных в промышленных условиях, если они отвечают требованиям раздела *4.1.1. «Реактивы»,* а также выдерживают испытание «Проверка пригодности хроматографической системы», описанное в частной статье. Рекомендуется каждую партию получаемых пластинок, приготовленных в промышленных условиях, проверять на близость величин R_f.

Близость величин R_f. Испытания проводят не менее чем на трех пластинках испытуемой партии. Для этого используют методику проверки хроматографической разделяющей способности, указанной в разделе *4.1.1. «Реактивы» («ТСХ пластинка с слоем силикагеля»)*. На линию старта каждой пластинки наносят по 5 пятен *раствора для проверки пригодности ТСХ пластинок Р*, хроматографируют и рассчитывают величины R_f красителей для каждого нанесения. В пределах каждой пластинки наибольшая разница величин R_f среди разных нанесений для каждого красителя не должна превышать 0.02. В противном случае такие пластинки не рекомендуется использовать для фармакопейного анализа.

Предварительная подготовка пластинок. В некоторых случаях может понадобиться промывка пластинок перед хроматографированием, которая может быть выполнена посредством предварительного элюирования чистых пластинок подходящим растворителем. Пластинки могут быть также импрегнированы (пропитаны) посредством таких процедур, как элюирование, погружение или опрыскивание. Перед использованием пластинки активируют, если необходимо, посредством нагревания в термостате при температуре от 100^{o}С до 105^{o}С в течение 1 часа.

Допускаются другие условия активации пластинок, описанные в частных статьях.

Хроматографическая камера представляет собой емкость с плотно подогнанной крышкой и с плоским дном или дном с двумя желобами из инертного прозрачного материала, соответствующими по размеру используемым пластинкам. Для горизонтального элюирования хроматографическая камера имеет желоб для подвижной фазы и дополнительно содержит устройство для подачи подвижной фазы к неподвижной фазе.

В необходимых условиях допускается использование хроматографических камер других типов с описанием их в частных статьях.

Микропипетки, микрошприцы, калиброванные капилляры или другие устройства, пригодные для нанесения растворов.

Устройство для обнаружения или тушения флуоресценции.

Проявляющие реактивы – для обнаружения разделенных веществ посредством опрыскивания, обработки парами или погружения.

МЕТОДИКА

Если нет других указаний в частной статье, хроматографическое разделение выполняют восходящим способом в насыщенной атмосфере.

Предпочтительнее использовать такие подвижные фазы, которые обеспечивают величины R_f испытуемых соединений в пределах от 0,3 до 0,7.

Вертикальное элюирование. Стенки хроматографической камеры выстилают фильтровальной бумагой. Подвижную фазу наливают в камеру в количестве, достаточном для того, чтобы после смачивания фильтровальной бумаги покрыть дно камеры слоем жидкости, необходимым для хроматографирования. Для насыщения хроматографическую камеру с подвижной фазой закрывают крышкой и выдерживают в течение 1 часа при температуре от 20°С до 25°С.

Слой жидкости в хроматографической камере должен быть таким, чтобы после помещения в него пластинки пятна или полосы находились над уровнем жидкости.

Объемы растворов анализируемых веществ, указанные в частной статье, наносят небольшими порциями, получая полосы или круглые пятна на подходящем расстоянии от нижнего края и от боковых краев пластинки. Растворы наносят на линию, параллельную нижнему краю пластинки, с расстоянием не менее 10 мм между пробами.

Если нет других указаний в частной статье, пятна или полосы наносят на расстоянии не менее 15 мм от нижнего края и не менее 10 мм от боковых краев пластинки.

После испарения растворителей из нанесенных проб пластинку помещают в хроматографическую камеру как можно более вертикально, следя за тем, чтобы пятна или полосы находились выше поверхности подвижной фазы. Камеру закрывают, оставляют ее при температуре от 20°С до 25°С в защищенном от прямых солнечных лучей месте. После того как подвижная фаза пройдет расстояние, указанное в частной статье, пластнику вынимают, сушат и обнаруживают пятна способом, указанным в частной статье.

В случае двухмерной хроматографии после первого хроматографирования пластинку сушат и выполняют второе хроматографирование в направлении, перпендикулярном первому.

Горизонтальное элюирование. Объемы растворов анализируемых веществ, указанные в частной статье, наносят небольшими порциями, получая круглые пятна (от 1 мм до 2 мм в диаметре) или полосы (длиной от 5 мм до 10 мм и шириной от 1 мм до 2 мм) на подходящем расстоянии от нижнего края и от боковых краев пластинки (# если нет других указаний в частной статье, пятна или полосы наносят на расстоянии не менее 15 мм от нижнего края и не менее 10 мм от боковых краев пластинки). Растворы наносят на линию, параллельную нижнему краю пластинки, с интервалом не менее 5 мм между нанесенными пробами.

После испарения растворителей из нанесенных проб в желоб хроматографической камеры вводят с помощью шприца или пипетки достаточное количество подвижной фазы, помещают пластинку горизонтально в хроматографическую камеру и подсоединяют устройство для подачи подвижной фазы в соответствии с инструкцией производителя. Если указано в частной статье, пластинку элюируют, начиная одновременно с двух концов. Камеру закрывают и проводят хроматографирование при температуре от 20°С до 25°С. После того, как подвижная фаза пройдет расстояние, указанное в частной статье, пластинку вынимают, сушат и обнаруживают пятна указанным способом.

В случае двухмерной хроматографии после первого хроматографирования пластинку сушат и выполняют второе хроматографирование в направлении, перпендикулярном первому.

ВИЗУАЛЬНАЯ ОЦЕНКА

Идентификация. Основное пятно на хроматограмме, полученной для испытуемого раствора, сравнивают визуально с соответствующим пятном на хроматограмме, полученной для раствора стандартного образца (раствора сравнения), сравнивая окраску (цвет флуоресценции), размер и величину удерживания (R_f) обоих пятен.

Величину удерживания (R_f) определяют как отношение расстояния от точки нанесения пятна до центра кромки пятна после хроматографирования к расстоянию, пройденному фронтом растворителя от точки нанесения.

Проверка разделяющей способности неподвижной фазы для идентификации. Обычно для оценки пригодности достаточно испытания на пригодность неподвижной фазы, описанного в разделе «Реактивы». В особых случаях дополнительные требования указывают в частных статьях.

Испытание на сопутствующие примеси. Дополнительное пятно (пятна) на хроматограмме, полученной для испытуемого раствора, сравнивают визуально с соответствующим пятном (пятнами) на хроматограмме, полученной для раствора сравнения. В качестве стандартного образца для приготовления раствора сравнения используют как саму примесь (примеси), так и различные разбавления испытуемого раствора.

Проверка разделяющей способности. Требования для проверки разделяющей способности приводят в соответствующих частных статьях.

Проверка чувствительности. Чувствительность считается удовлетворительной, если пятно или полоса четко обнаруживаются на хроматограмме, полученной с наиболее разбавленным раствором сравнения.

Проверка пригодности хроматографической системы. Результаты анализа методом тонкослойной хроматографии считаются достоверными, если выполняются требования испытания «Проверка пригодности хроматографической системы».

Хроматографическая система считается пригодной если:

- на хроматограмме раствора сравнения, используемого для проверки пригодности хроматографической системы, четко разделяются пятна указанных в частной статье веществ;

- величина R_f основного пятна на хроматограмме испытуемого раствора должна быть близка, указанной в частной статье;

- на хроматограмме раствора сравнения, используемого для проверки чувствительности хроматографической системы, должно быть четко видно пятно.

СПОСОБЫ ОЦЕНКИ СОДЕРЖАНИЯ ПРИМЕСЕЙ МЕТОДОМ ТСХ

При контроле примесей нежелательно включение в частную статью требования отсутствия пятна контролируемой примеси на хроматограмме испытуемого раствора.

Методом ТСХ могут контролироваться как конкретно указываемые (специфические) примеси, так и общее содержание примесей.

Контроль специфических примесей. Контроль специфических примесей применяют в тех случаях, когда содержание каких-то конкретных примесей, возникающих в процессе производства лекарственного средства или его хранения, должно быть ограничено ввиду их токсичности или по другим соображениям.

При контроле специфических примесей обычно используют сравнение пятен регламентированных примесей на хроматограммах испытуемого раствора и раствора сравнения.

Контроль общего содержания примесей. В тех случаях, когда нет оснований считать какие-то примеси особо токсичными, часто не так важно знать их истинное содержание. Важно знать, что это содержание не превосходит определенного уровня. В таких случаях используют метод внутренней нормализации – в качестве растворов сравнения обычно используют растворы самой испытуемой субстанции различной концентрации, а содержание примесей находят в пересчете на эту субстанцию.

В зависимости от количества различных растворов субстанции, наносимых на хроматограмму в виде растворов сравнения, контроль общего содержания примесей может быть одноуровневым, двухуровневым и трехуровневым.

В двух- и трехуровневом вариантах возможна регламентация и общей суммы примесей.

КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ИЗМЕРЕНИЯ

Требования к разрешению и разделению приводят в частных статьях.

В том случае, когда вещества, разделяемые методом тонкослойной хроматографии, поглощают или флуоресцируют в ультрафиолетовом или видимом свете, их можно количественно определить непосредственно на пластинке, используя подходящее оборудование. Для этого измеряют отражение или пропускание падающего света, передвигая пластинку или измеряющее устройство. Аналогичным образом, используя подходящее оптическое оборудование, можно измерять флуоресценцию. Вещества, содержащие радионуклиды, могут быть количественно определены тремя способами:

- непосредственно на пластинке – передвижением пластинки вдоль подходящего счетчика радиоактивности или счетчика радиоактивности вдоль пластины («Радиофармацевтические препараты»);

- разрезанием пластинки на полосы и измерением радиоактивности на каждой полосе, используя подходящий счетчик радиоактивности;

- соскребанием неподвижной фазы, растворением ее в подходящем сцинтилляционном коктейле и измерением радиоактивности с использованием жидкостного сцинтилляционного счетчика.

Оборудование. Оборудование для измерений непосредственно на пластинке включает в себя:

- устройство для прямого нанесения в определенном месте пластинки необходимого количества вещества;

- механическое устройство для передвижения пластинки или измерительного устройства вдоль осей X или У;

- самописец и интегратор или компьютер;

- *для веществ, поглощающих или флуоресцирующих в ультрафиолетовом или видимом свете:* для измерения отражения или пропускания используются фотометр с источником света, оптическое устройство, генерирующее монохроматический свет, и фотоячейку соответствующей чувствительности; в том случае, когда измеряется флуоресценция, требуется дополнительно монохроматический фильтр для выбора соответствующей спектральной области излучаемого света;

- *для веществ, содержащих радионуклиды:* подходящий счетчик радиоактивности; для него необходимо проверить линейный диапазон.

Методика. Готовят способом, указанным в частной статье, раствор анализируемого вещества (испытуемый раствор) и, если необходимо, растворы стандартных образцов анализируемых веществ в том же растворителе (растворы сравнения). Наносят одинаковый объем каждого раствора на пластинку и хроматографируют.

Для веществ, поглощающих или флуоресцирующих в ультрафиолетовом или видимом свете. Готовят и наносят не менее трех растворов сравнения, концентрации которых охватывают ожидаемое значение концентрации в испытуемом растворе (около 80%, 100% и 120% от этой концентрации). Опрыскивают, если необходимо, указанным реактивом и регистрируют отражение, пропускание или флуоресценцию на хроматограммах, полученных для испытуемого раствора и растворов сравнения. По полученным данным рассчитывают количество вещества в испытуемом растворе.

Для веществ, содержащих радионуклиды. Готовят и наносят испытуемый раствор, содержащий около 100% ожидаемого значения концентрации. Измеряют радиоактивность как функцию длины пути и записывают радиоактивность каждого полученного пика в процентах от суммарной радиоактивности.

Если нет других указаний в частной статье, результаты определения считают недействительными, если коэффициент разделения *(R_S)* между измеряемыми на хроматограмме пиками менее 1,0.

2.2.28. ГАЗОВАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Газовая хроматография (ГХ) представляет собой метод разделения, в котором подвижной фазой является газ (газ-носитель), а неподвижной фазой, помещенной в колонку, является твердое вещество или жидкость, нанесенные на твердый инертный носитель или равномерно покрывающие внутренние стенки колонки.

Газовая хроматография основана на механизмах адсорбции и/или распределения.

Оборудование. Оборудование состоит из системы подачи газов, устройства ввода пробы, хроматографической колонки, детектора и регистрирующего устройства. Колонки обычно изготавливают из стекла или нержавеющей стали и заполняют неподвижной фазой. Газ-носитель проходит с заданной скоростью через устройство ввода пробы, колонку, а затем через детектор.

Определение проводят при постоянной температуре колонки или в соответствии с заданной температурной программой.

Используемый детектор должен обеспечивать определение тех количеств анализируемых веществ, которые элюируются из колонки. Обычно используют пламенно-ионизационный детектор, детектор по теплопроводности, термоионный детектор и электронозахватный детектор.

Методика. Колонку, устройство ввода пробы и детектор термостатируют при указанной температуре (# перед использованием колонка должна быть кондиционирована). Готовят испытуемый раствор и раствор(ы) сравнения, как указано в частной статье. При помощи растворов сравнения настраивают прибор и подбирают объемы вводимых проб, которые позволяют получить необходимый сигнал. Выполняют повторные введения для проверки сходимости сигнала и проверяют, если необходимо, число теоретических тарелок.

Вводят растворы и регистрируют результаты хроматографирования. Для проверки сходимости сигнала выполняют повторные введения. Определяют площади пиков анализируемых компонентов. В случае, если коэффициент симметрии, вычисленный, как описано ниже, имеет значение от 0,8 до 1,20, допускается определение по высоте пиков. При использовании программирования температуры необходимо проводить определение по площадям пиков. При использовании внутреннего стандарта следует удостовериться, что ни один из пиков, относящихся к анализируемому веществу или его примеси, не маскируется пиком внутреннего стандарта.

Если указано в частной статье, процентное содержание одного или нескольких компонентов анализируемой пробы определяют посредством вычисления процентной доли площади соответствующего пика или пиков в суммарной площади всех пиков, исключая пики растворителей или добавленных реактивов (метод внутренней нормализации). В этих случаях рекомендуется использование широкодиапазонного усилителя и автоматического интегратора.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Абсолютная градуировка. Испытуемый раствор и раствор сравнения попеременно хроматографируют на газовом хроматографе в условиях, указанных в частной статье. Для испытуемого раствора и раствора сравнения рассчитывают средние значения площадей или высот пиков анализируемого вещества. По полученным средним значениям рассчитывают концентрацию анализируемого вещества в испытуемом растворе.

Метод внутреннего стандарта. Для каждой хроматограммы сначала рассчитывают отношение площади или высоты пика анализируемого вещества к площади или высоте пика внутреннего стандарта. Полученные отношения усредняют для испытуемого раствора и раствора сравнения и по найденным средним значениям определяют концентрацию анализируемого вещества в испытуемом растворе.

Методика. Полная неопределенность методики анализа должна соответствовать требованиям статьи *«Валидация аналитических методик и испытаний*. Раздел D. Критерии проведения валидации методик количественного определения».

При этом необходимо, чтобы неопределенность пробоподготовки была незначима по-сравнению с полной неопределенностью методики анализа (см. там же).

Рекомендуется использовать следующую методику проведения конечной аналитической операции (хроматографирования). Хроматографируют несколько раз (n_o) раствор сравнения и определяют относительное стандартное отклонение (*RSD*) хроматографического сигнала (площадь или высота пика в случае абсолютной калибровки, отношения площади или высоты пика к площади или высоте пика внутреннего стандарта в методе внутреннего стандарта). Величина n_o является достаточной, если значение *RSD* не превышает значение RSD_{max}. Значение RSD_{max}. является характеристикой теста “Проверка пригодности хроматографической системы” и должна соответствовать требованиям Табл. 1.

Таблица 1.

Требования к RSD_{max}. При проведении количественного определения на этапе проверки пригодности хроматографической системы (предполагается, что неопределенность пробоподготовки незначительна в сравнении с полной неопределенностью методики анализа)

n_o	2	3	4	5	6	7	8
RSD_{max}.(%)							
Превышение верхнего предела определения испытуемого вещества над 100% (%)	**Субстанции**						
1	0.16	0.42	0.60	0.74	0.86	0.96	1.06
1.5	0.24	0.63	0.90	1.11	1.29	1.44	1.58
2	0.32	0.84	1.20	1.48	1.72	1.93	2.11
3	0.48	1.26	1.80	2.23	2.58	2.89	3.17
Полусумма верхнего и нижнего предела содержания испытуемого вещества к номинальному значению (%)	**Готовые лекарственные средства**						
5	0.25	0.67	0.96	1.19	1.38	1.54	1.69
7.5	0.38	1.01	1.44	1.78	2.06	2.31	2.53

10	0.51	1.34	1.92	2.37	2.75	3.08	3.38
15	0.76	2.01	2.88	3.56	4.13	4.62	5.07
20	1.01	2.68	3.85	4.75	5.50	6.16	6.76

Если полученное значение *RSD*. не превышает значение RSD_{max}., приведенное в Табл.1., попеременно хроматографируют одинаковое количество $n \geq n_0$ раз раствор сравнения и испытуемый раствор (или несколько испытуемых растворов, если анализируют несколько серий).

Возможно значительное изменение величины *n* за предел объединения выборок растворов сравнения и анализируемого (ых) раствора (ов) от предела объединенного стандартного отклонения (см. статью *«Статистический анализ результатов химического эксперимента»*).

КОНТРОЛЬ ПРИМЕСЕЙ

Для контроля примесей обычно используют следующие подходы.

1. *Количественное определение примеси с использованием раствора сравнения с известной концентрацией примеси (обычно в методе абсолютной калибровки).* Такой подход предполагает одинаковый сигнал примеси в присутствии и в отсутствии основного вещества.

2. *Метод внутренней нормализации.* Такой подход предполагает выполнение линейности в широком диапазоне и может потребовать учета различий в сигналах примеси и основного вещества. Его часто применяют для определения суммы примесей. При этом сумму площадей всех пиков на хроматограмме (без учета пика растворителя) принимают за 100% и содержание каждой конкретной примеси или суммы примесей находят как долю площади пика этой примеси или суммы площадей пиков примесей в общей сумме площадей всех пиков на хроматограмме.

3. *Сравнение с разбавленным раствором основного вещества.*

4. *Метод стандартных добавок.* К анализируемой пробе прибавляют известное количество примеси. По данным хроматографирования испытуемой пробы и испытуемой пробы с добавкой определяют содержание примеси. Для повышения точности возможно использование метода внутреннего стандарта.

\# **Пригодность хроматографической системы.** Результаты анализа считаются достоверными, если выполняются требования теста «Проверка пригодности хроматографической системы». Данный тест обычно проводят с использованием растворов сравнения.

Если нет других указаний в частной статье, хроматографическая система считается пригодной при выполнении следующих условий:

- относительные времена удерживания указанных веществ должны быть около регламентируемых значений;
- число теоретических тарелок (эффективность хроматографической системы), рассчитанное по указанному пику, должно быть не менее регламентируемой величины;
- коэффициент разделения указанных пиков должен быть не менее указанной величины;
- относительное стандартное отклонение, рассчитанное для высоты или площади указанного пика или их отношений к высоте или площади внутреннего стандарта из хроматограмм раствора сравнения, должно быть не более регламентируемой величины; для расчета относительного стандартного отклонения используют данные пяти параллельных хроматограмм; если требуемое относительное стандартное отклонение

превышает 2.0%, его расчет проводят, используя данные шести или более параллельных хроматограмм;

- коэффициент асимметрии указанного пика, рассчитанный из хроматограмм раствора сравнения, должен быть в пределах, указанных в частной статье.

Для обеспечения выполнения требований теста «Проверка пригодности хроматографической системы» допускается модификация хроматографических условий, описанных в частной статье (изменение температуры термостата колонок и/или расход газа-носителя).

ПАРОФАЗНАЯ ГАЗОВАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Парофазная газовая хроматография является методом, наиболее подходящим для разделения и определения летучих соединений, которые присутствуют в твердых или жидких образцах. Метод основан на анализе газовой фазы, находящейся в равновесии с твердой или жидкой фазой.

Оборудование. Оборудование состоит из газового хроматографа, снабженного устройством для ввода газовой фазы, находящейся над испытуемым образцом. Устройство ввода может быть подсоединено к блоку, автоматически контролирующему и регулирующему давление и температуру. При необходимости используют устройство для удаления растворителей.

Возможно использование других способов ввода газовой фазы в хроматографическую колонку.

Анализируемую пробу вводят в контейнер, снабженный подходящей пробкой и клапанной системой, которая регулирует прохождение газа-носителя. Контейнер помещают в термостатируемую камеру с температурой, устанавливаемой в соответствии со свойствами анализируемого образца.

Пробу выдерживают при заданной температуре в течение времени, достаточном для установления равновесия между твердой или жидкой фазой и газовой фазой.

В контейнер вводят газ-носитель и по истечении указанного времени открывают клапан, чтобы газ поступал в хроматографическую колонку, перенося с собой перешедшие в газовую фазу компоненты.

Методика. Настраивают прибор для получения необходимого сигнала, используя подготовленные образцы сравнения

а) Метод прямой градуировки

В одинаковые флаконы раздельно помещают анализируемую пробу и каждый из образцов сравнения, приготовленные, как указано в частной статье, избегая контакта между устройством для ввода проб и образцами.

Флаконы герметично закрывают и помещают в термостатируемую камеру с температурой и давлением, указанными в частной статье. После установления равновесия газовую фазу хроматографируют в указанных условиях.

б) Метод стандартных добавок

Равные объемы анализируемой пробы помещают в одинаковые указанные в частной статье флаконы. Во все флаконы, кроме одного, прибавляют указанные количества раствора сравнения, содержащего известную концентрацию анализируемого вещества, для получения ряда образцов, с равномерно увеличивающимися концентрациями этого вещества.

Флаконы герметично закрывают и помещают в термостатируемую камеру с температурой и давлением, указанными в частной статье. После установления равновесия хроматографируют газовую фазу в указанных условиях.

Уравнение линейной зависимости рассчитывают методом наименьших квадратов. По полученному уравнению определяют концентрацию анализируемого вещества в испытуемой пробе.

Допускается определение концентрации с использованием графического метода. Для этого по оси ординат откладывают средние значения полученных результатов, а по оси абсцисс - концентрации стандартных добавок анализируемого вещества. Экстраполируют линию, проходящую через полученные точки, до пересечения с осью абсцисс. Расстояние между этой точкой и началом координат представляет собой концентрацию анализируемого вещества в испытуемом растворе.

c) Метод последовательных отборов

Применение данного метода описывают в частной статье.

2.2.29. ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Жидкостная хроматография (ЖХ) представляет собой метод разделения, в котором подвижной фазой является жидкость, а неподвижной фазой, помещенной в колонку, является тонкодисперсное твердое вещество или жидкость, нанесенная на твердый тонкодисперсный носитель, или химически модифицированный тонкодисперсный носитель посредством введения органических групп.

Жидкостная хроматография основана на механизмах адсорбции, распределения, ионного обмена или разделения по размерам молекул.

Оборудование. Оборудование обычно состоит из системы подачи подвижной фазы, устройства ввода пробы (с использованием автосамплера или петлевого дозатора), хроматографической колонки, детектора, дегазатора и регистрирующего устройства. Подвижная фаза обычно подается под давлением из одной или нескольких емкостей и протекает через устройство ввода пробы, колонку, а затем через детектор с заданной скоростью.

Температуру хроматографической колонки поддерживают постоянной. Состав подвижной фазы, в зависимости от указанного в частной статье, может или оставаться постоянным на протяжении всего анализа (изократическое элюирование), или может изменяться в соответствии с задаваемой программой (градиентное элюирование).

Используемый детектор должен обеспечивать определение тех количеств анализируемых веществ, которые элюируются из колонки. Обычно для детектирования используют абсорбционную спектрофотометрию, а также дифференциальную рефрактометрию, флуориметрию, сжигание и электрохимические методы.

Методика. Колонку уравновешивают при указанном составе подвижной фазы. Готовят испытуемый раствор и раствор(ы) сравнения, как указано в частной статье. Растворы не должны содержать твердых частиц. Используя растворы сравнения, настраивают прибор и подбирают объемы вводимых проб, которые позволяют получить необходимый (адекватный) сигнал. Выполняют повторные введения для проверки сходимости сигнала и проверяют, если необходимо, число теоретических тарелок.

Вводят растворы и регистрируют результаты хроматографирования. Для проверки сходимости сигнала выполняют повторные введения. Определяют площади пиков анализируемых компонентов. В случае, если коэффициент асимметрии, вычисленный, как описано ниже, имеет значение от 0.8 до 1.20, допускается проводить определение по высоте пиков. При использовании градиентного элюирования необходимо проводить определение по площадям пиков. При использовании внутреннего стандарта следует удостовериться, что ни один из пиков анализируемого вещества или его примеси не маскируется пиком внутреннего стандарта.

Из полученных значений вычисляют содержание определяемого компонента или компонентов. Если указано в частной статье, процентное содержание одного или нескольких компонентов анализируемой пробы определяют посредством вычисления процентной доли площади соответствующего пика или пиков к суммарной площади всех пиков, исключая пики растворителей или добавленных реактивов (метод внутренней нормализации). В этих случаях рекомендуется использование широкодиапазонного усилителя и автоматического интегратора.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Абсолютная градуировка. Если нет других указаний в частной статье, испытуемый раствор и раствор сравнения попеременно хроматографируют на жидкостном хроматографе, получая не менее пяти хроматограмм, в условиях, указанных в частной статье. Для испытуемого раствора и раствора сравнения рассчитывают средние значения площадей или высот пиков анализируемого вещества. По полученным средним значениям рассчитывают концентрацию анализируемого вещества в испытуемом растворе.

Метод внутреннего стандарта. Для каждой хроматограммы сначала рассчитывают отношение площади или высоты пика анализируемого вещества к площади или высоте пика внутреннего стандарта. Полученные отношения усредняют для испытуемого раствора и раствора сравнения и по найденным средним значениям определяют концентрацию анализируемого вещества в испытуемом растворе.

КОНТРОЛЬ ПРИМЕСЕЙ

Для контроля примесей обычно используют следующие подходы.

1. Количественное определение примеси с использованием раствора сравнения с известной концентрацией примеси (обычно в методе абсолютной калибровки). Такой подход предполагает одинаковый сигнал примеси в присутствии и в отсутствии основного вещества.

2. Метод внутренней нормализации. Такой подход предполагает выполнение линейности в широком диапазоне и может потребовать учета различий в чувствительности детектора по отношению к примеси и основному веществу. Его часто применяют для определения суммы примесей. При этом сумму площадей всех пиков на хроматограмме (без учета пика растворителя) принимают за 100% и содержание каждой конкретной примеси или суммы примесей находят как долю площади пика этой примеси или суммы площадей пиков примесей в общей сумме площадей всех пиков на хроматограмме.

3. Сравнение с разбавленным раствором основного вещества.

4. Метод стандартных добавок. К анализируемой пробе прибавляют известное количество примеси. По данным хроматографирования испытуемой пробы и испытуемой пробы с добавкой определяют содержание примеси. Для повышения точности возможно использование метода внутреннего стандарта.

Пригодность хроматографической системы. Результаты анализа считаются достоверными, если выполняются требования теста «Проверка пригодности хроматографической системы». Данный тест обычно проводят с использованием растворов сравнения.

Если нет других указаний в частной статье, хроматографическая система считается пригодной при выполнении следующих условий:

- относительные времена удерживания указанных веществ должны быть около регламентируемых значений;

- число теоретических тарелок (эффективность хроматографической системы), рассчитанное по указанному пику, должно быть не менее регламентируемой величины;
- коэффициент разделения указанных пиков, рассчитанный из хроматограмм раствора сравнения, должен быть не менее указанной величины;
- относительное стандартное отклонение, рассчитанное для высоты или площади указанного пика или их отношений к высоте или площади внутреннего стандарта из хроматограмм раствора сравнения, должно быть не более указанной величины; для расчета относительного стандартного отклонения используют данные пяти параллельных хроматограмм;
- коэффициент симметрии указанного пика, рассчитанный из хроматограмм раствора сравнения, должен быть в пределах, указанных в частной статье.

Для обеспечения выполнения требований теста «Проверка пригодности хроматографической системы» допускается модификация хроматографических условий, описанных в частной статье.

2.2.30. ЭКСКЛЮЗИОННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Эксклюзионная хроматография представляет собой хроматографический метод, в котором процесс распределения молекул в растворе происходит в соответствии с их размерами. В случае использования органической подвижной фазы метод называют *гель-проникающей хроматографией*, а в случае использования водной подвижной фазы – *гель-фильтрационной хроматографией*. Проба вводится в колонку, заполненную гелем или пористыми частичками наполнителя, и переносится подвижной фазой через колонку. Распределение в соответствии с размерами происходит в процессе движения и многоразовых обменов молекул растворенного вещества между молекулами растворителя (подвижной фазы) и тем же самым растворителем, находящимся в порах материала, которым заполнена колонка. Диапазон размеров распределенных молекул определяется диапазоном размеров пор наполнителя.

Достаточно маленькие молекулы, способные проникать во все поры материала, элюируются в полном объеме колонки (V_t *– полный проникающий объем или граница эксклюзии*). Молекулы с размерами, превышающими размер всех пор материала колонки, мигрируют лишь сквозь простор между частицами наполнителя, не препятствуя им, и элюируются в свободном объеме колонки (Vo – объем эксклюзии или мертвый объем). Распределение молекул в соответствии с размерами происходит между свободным объемом и полным объемом колонки; наиболее эффективное распределение происходит в первые две трети даного диапазона.

Оборудование. Специфичной частью оборудования является хроматографическая колонка подходящих размеров, заполненная материалом, который обеспечивает распределение молекул соответствующих размеров в необходимом диапазоне. Если необходимо, колонку термостатируют. Через колонку с постоянной скоростью пропускают элюент. К одному концу колонки обычно присоединяют приспособление для введения пробы, например, инжектор с прерывателем потока, шприцевой инжектор с мембраной для введения пробы без приостановки потока или петлевой инжектор с клапаном, который перекрывает поток. К этому же концу колонки также может быть присоединен соответствующий насос для подачи элюента с контролируемой скоростью. Проба может также наноситься непосредственно на сухую поверхность материала колонки или, если вязкость пробы превышает вязкость элюента, проба может наслаиваться на поверхность материала колонки под элюент. Другой конец колонки обычно присоединяют к соответствующему детектору с приспособлением, регистрирующим и обеспечивающим контроль соответствующих концентраций распределенных компонентов пробы. Обычно используют детекторы: фотометрический, рефрактометрический или

люминесцентный. При необходимости, может быть присоединен автоматический коллектор фракций.

В качестве наполнителя может использоваться или мягкий материал, такой как набухший гель, или твердый, такой как пористое стекло, силикагель или подходящий для данного растворителя поперечно-сшитый органический полимер. При использовании твердых материалов обычно применяют принудительную подачу подвижной фазы под давлением, что ускоряет разделение. Подвижную фазу выбирают исходя из природы пробы, наполнителя и метода детектирования.

Указания по обработке материала для заполнения колонки перед выполнением распределения и наполнения колонки представлены в соответствующей частной статье или инструкции изготовителя.

Условия хроматографирования, такие, например, как размер колонки, скорость подвижной фазы, объем вводимой пробы и другие параметры, обозначенные в частной статье, не являются строго регламентированными и могут варьировать. При этом должны выполняться условия теста *«Пригодность хроматографической системы» (2.2.46)*, и данный тест может учитывать влияние таких изменений на полученные результаты.

Определение относительного компонентного состава смесей

Распределение проводят, как описано в частной статье. При возможности записывают хроматограмму, полученную в процессе распределения, и измеряют площадь соответствующих пиков. Если чувствительность одинаковая для всех компонентов пробы (например, они имеют одинаковое удельное оптическое поглощение), относительное содержание каждого компонента рассчитывают как отношение площади пика соответствующего компонента к сумме площадей пиков всех компонентов. Если для разных компонентов пробы чувствительность разная, содержание каждого компонента рассчитывают с помощью градуировочных графиков, полученных с использованием соответствующих стандартных веществ для градуировки, как указано в частной статье.

Определение молекулярных масс

Эксклюзионная хроматография может быть использована для определения молекулярных масс веществ путем сравнения с соответствующими стандартными веществами для градуировки, указанными в частной статье.

Для молекулярных масс стандартных веществ строят график зависимости объема удерживания от логарифма молекулярных масс.

График, выстроенный в пределах, ограниченных значениями объема эксклюзии и полного объема проникновения обычно приближается к прямой линии для данной колонки в данных экспериментальных условиях. На основании этого графика могут быть рассчитаны молекулярные массы. Использование метода градуировки для молекулярно-массового разделения позволяет получать достоверные результаты лишь для частных случаев систем высокомолекулярное вещество/растворитель в описанных экспериментальных условиях.

Определение молекулярно-массового рапределения полимеров

Эксклюзионная хроматография может быть использована для определения молекулярно-массового распределения полимеров. Однако сравнить между собой результаты можно лишь в одинаковых экспериментальных условиях. Стандартные вещества, используемые для градуировки, и методики анализа описывают в соответствующих частных статьях.

2.2.31. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ

ОБЩИЙ ПРИНЦИП

Под действием электрического поля заряженные частички, растворенные или диспергированные в растворе электролита, передвигаются в направление к электроду противоположной полярности, # а молекулы с положительными и отрицательными зарядами передвигаются в направлении их суммарного заряда. # Скорость передвижения прямо пропорциональна суммарному заряду частицы и обратно пропорциональна ее размеру, либо молекулярной массе.

Электрофоретическая подвижность является величиной, характерной для данного вещества. Различают абсолютную и относительную электрофоретическую подвижность. Абсолютная электрофоретическая подвижность под влиянием градиента потенциала 1 В на 1 см измеряется в сантиметрах в секунду. Относительная электрофоретическая подвижность есть отношение подвижности исследуемого вещества к подвижности другого вещества, принятого за стандарт.

В гель-электрофорезе движение частиц замедляется взаимодействием с окружающей матрицей геля, что действует как молекулярное сито. Встречные взаимодействия электрической силы и молекулярного сита приводят к диференциации скорости передвижения частиц в зависимости от их размеров, форм и зарядов. В ходе электрофореза из-за различия физико-химических свойств, разные макромолекулярные смеси передвигаются с разной скоростью и, таким образом, разделяются на дискретные фракции. Электрофоретическое разделение может быть проведено в системах без неподвижных фаз (например, свободное разделение раствора в капилярном электрофорезе) и в стабилизированных средах, таких как тонкослойные пластинки, пленки или гели.

Существует два различных метода электрофореза: фронтальный и зональный. Фронтальный электрофорез проводят в свободной незакрепленной среде, и он является единственным способом определения абсолютной электрофоретической подвижности. Зональный электрофорез проводят в закрепленной среде, роль которой состоит в стабилизации электрофоретических зон.

ЭЛЕКТРОФОРЕЗ СО СВОБОДНОЙ ИЛИ ПОДВИЖНОЙ ГРАНИЦЕЙ

Этот метод обычно используется для определения электрофоретической подвижности, экспериментальной характеристики веществ, непосредственно измеренной и воспроизведенной. Этот метод обычно применяется для веществ с высокой молекулярной массой, которые имеют малую диффузию. Границы первоначально определяются физическими методами, например, рефрактометрией или кондуктометрией. Под действием определенного электрического поля в течение точно измеряемого времени определяют новые границы и их относительное положение. Условия испытания подбирают так, чтобы можно было определять столько границ, сколько веществ присутствует в испытуемом образце.

ЗОНАЛЬНЫЙ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФАЗЫ НОСИТЕЛЯ

Этот метод обычно используется лишь для небольших образцов испытуемых веществ.

Природа носителя, например, бумага, гель агара, ацетат целлюлозы, крахмал, агароза, полиакриламид, смешанный гель, служит причиной ряда дополнительных факторов, влияющих на подвижность:

- а) вследствие наличия каналов в фазе носителя, среднее растояние, которое проходит вещество, становится меньше реально пройденного расстояния;

- б) некоторые фазы носителя электрически не нейтральны. Поскольку носители являются неподвижной фазой, это иногда может приводить к значительно большему электроэндоосмотическому потоку;

- в) какое-нибудь нагревание в результате эффекта Джоуля может вызвать некоторое испарение жидкости с фазы носителя, что, в следствие капиллярности, приводит к движению раствора в направлении от краев к центру. Ионная сила в этом случае возрастает.

Следовательно, скорость передвижения зависит от таких главных факторов: подвижности заряженной частицы, потока скорости электроэндоосмоса и испарения жидкости с фазы носителя, а также силы (напряжения поля). Поэтому необходимо проводить испытание в строго определенных экспериментальных условиях и, по возможности, использовать стандартные вещества.

Прибор для электрофореза состоит из:

- *источника постоянного тока*, напряжение которого можно контролировать и, желательно, стабилизировать;

- *электрофоретической камеры*. Обычно это камера из стекла или твердой пластмассы, которая состоит из двух отдельных резервуаров – анодного и катодного, содержащих раствор электролита. В каждый резервуар камеры погружается электорд, напрмер, платиновый или графитовый. Они присоединяются изолированной схемой к соответствующему выходу источника питания и образуют анод и катод. Уровень жидкости в обоих резервуарах камеры поддерживается одинаковым для избежания переливания через сифон.

Электрофоретическая камера снабжена воздухонепроницаемой крышкой, которая поддерживает атмосферу насыщенной влажности на протяжении испытания и уменьшает испарение растворителя. При снятии крышки ток отключается предохранителем. Если электродвижущая сила измерена в интервале, превышающим 10 В, желательно охладить носитель;

- *приспособления установки носителя:*

Электрофорез на полосках. Полоски с носителем, поочередно смоченные электродным раствором, погружают в электродный резервуар, закрепляют и фиксируют соответствующим держателем для предупреждения диффузии электролита. Такими держателями могут быть горизонтальная рамка, направленный V-образный штатив или однородная поверхность с точками контакта через определенные интервалы.

Гель-электрофорез. Приспособление в основном состоит из стеклянной пластинки, на поверхность которой нанесен слой хорошо закрепленного геля одинаковой толщины. Соединение геля с электродным раствором осуществляется разными способами в зависимости от типа используемого прибора. Необходимо принять меры для предупреждения конденсации воды или высушивания твердого слоя;

- *измерительного устройства или детектора.*

Методика. Раствор электролита помещают в электродный резервуар. Соответствующим образом импрегнированный носитель с электролитным раствором помещают в камеру с обозначенными для используемого прибора условиями. Устанавливают линию старта и наносят образец. Подают электрический ток в течение определенного времени. После отключения тока носитель вынимают из камеры, высушивают и проявляют.

ЭЛЕКТРОФОРЕЗ НА КОЛОНКАХ С ПОЛИАКРИЛАМИДНЫМ ГЕЛЕМ

При электрофорезе на колонках с полиакриламидным гелем стационарной фазой является гель, приготовленный из смеси акриламида и N,N'-метиленбисакриламида. Колонку с гелем готовят с использованием трубок длиной 7,5 см и внутренним диаметром 0,5 см.

Прибор. Состоит из двух вставленных вертикально один над одним резервуаров для буферного раствора, приготовленных из подходящего материала, например, поли(метил метакрилата). Каждый резервуар снабжен платиновым электродом. Электроды присоединены к источнику тока, что позволяет проводить испытание или при постоянном токе, или при постоянном напряжении. В основании верхнего резервуара имеется ряд держателей, равноудаленных от электрода.

Методика. Обычно растворы дегазируют до начала полимеризации и гели используют сразу после приготовления. Готовят предписанную смесь компонентов, заливают в соответствующие закрытые снизу стеклянные колонки до одинакового уровня около 1 см от верхнего края, избегая попадания пузырьков воздуха в колонки. На смесь геля наслаивают слой *воды Р*, чтобы исключить попадания воздуха, и оставляют для полимеризации. Гелеобразование обычно занимает около 30 минут и завершается, когда образуется четкое разделение поверхности геля и водного слоя. Водный слой удаляют. Нижний резервуар наполняют указанным буферным раствором. Колонки открывают и вставляют в держатели верхнего резервуара так, чтобы дно колонок было погружено в буферный раствор нижнего резервуара. Колонки осторожно наполняют указанным буферным раствором. Готовят испытуемые образцы и образцы сравнения, содержащие индикаторный краситель, и уплотняют путем растворения в них, например, *сахарозы Р*. Приготовленные образцы наслаивают на поверхность геля, используя для каждого образца отдельную колонку. Верхний резервуар наполняют тем же буферным раствором. Электроды подключают к источнику тока и проводят процесс электрофореза при указанных условиях: темературе, постоянном напряжении или токе. Источник тока отключают, когда индикаторный краситель почти переходит в нижний резервуар. Каждую колонку сразу вынимают из прибора и извлекают гель. Локализуют положение полос на электрофореграмме.

ЭЛЕКТРОФОРЕЗ С НАТРИЕМ ДОДЕЦИЛСУЛЬФАТОМ В ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ (ДСН-ПАГ)

Отрасль применения. Электрофорез в полиакриламидном геле применяется для качественной идентификации белков в биологических препаратах, контроля их чистоты и количественных определений.

Цель. Аналитический гель-электрофорез – метод, позволяющий идентифицировать и оценить гомогенность белков в лекарственных средствах. Метод обычно используется для определения молекулярных масс белковых субъединиц и субъединичного состава очищенных белков.

На рынке имеется разнообразный ассортимент готовых к использованию гелей и реактивов, которые могут быть использованы вместо описанных в общей статье, если получаются эквивалентные результаты и выполняются условия раздела “Валидация испытания”, приведенного ниже.

СВОЙСТВА ПОЛИАКРИЛАМИДНЫХ ГЕЛЕЙ

Ситовые свойства полиакриламидных гелей обусловлены тримерной сеткой геля, образующегося бифункциональным бисакриламидом, поперечно связанным (сшитым) с соседними акриламидными цепями. Процесс полимеризации катализируется свободно-радикалгенерирующей системой, образующейся с аммонием персульфатом и тетраметилэтилендиамином.

При увеличении концентрации акриламида в геле уменьшается эффективный размер пор. Эффективный размер пор геля оперативно определяется ситовыми свойствами, то есть, сопротивлением миграции макромолекул. Акриламид может использоваться только в определенных концентрациях. При высоких концентрациях акриламида гели чаще ломаются и являются сложными в обработке. Поскольку размер пор геля уменьшается, уменьшается скорость миграции белка через гель. Регулируя размер пор геля, изменяя концентрацию акриламида, можно оптимизировать условия разделения испытуемого белкового продукта. Следовательно, данный гель характеризуется содержанием и массовым соотношением акриламида и бисакриламида.

Кроме состава геля важным компонентом электрофоретической подвижности является структура белка. В случае определения белков, электрофоретическая подвижность зависит от значения pK заряженных групп и размера молекулы. На это влияют тип, концентрация и pH буфера, температура и сила электрического поля, а также природа материала носителя.

ДЕНАТУРИРУЮЩИЙ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ В ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ

Данный метод является примером анализа мономерных полипептидов с молекулярной массой от 14000 дальтон до 100000 дальтон. Возможно расширение границ молекулярных масс (например, путем использования градиентных гелей, особенностей буферной системы), но такие методики анализа не обсуждаются в данной статье.

Денатурирующий электрофорез в полиакриламидном геле с использованием натрия додецилсульфата (ДСН-ПАГ; SDS-PAGE) является наиболее общепринятым методом электрофореза, который используется для оценки качества белковых лекарственных средств и описан ниже в качестве примера указанного метода.

Обычно аналитический электрофорез белков проводят в полиакриламидных гелях в условиях, обеспечивающих диссоциацию белков на отдельные полипептидные субъединицы, что минимизирует их агрегацию.Чаще всего перед нанесением на гель белки подвергают диссоциации, нагревая их с сильным анионным детергентом – ДСН. Денатурированные полипептиды связываются с ДСН, превращаясь в отрицательно заряженные частички с постоянным отношением массы к заряду, независимо от типа белка. Поскольку количество связанного ДСН почти всегда пропорционально молекулярной массе полипептида и не зависит от его последовательности, ДСН-полипептидные комплексы мигрируют в полиакриламидном геле со скоростью, зависящей от размера полипептида.

Электрофоретическая подвижность полученных детергентполипептидных комплексов находится в функциональной взаимосвязи с их молекулярными массами. Миграция ДСН-комплексов происходит в направлении к аноду предположительно комплексы с низкими молекулярными массами движутся быстрее, чем с высокомолекулярными массами. Следовательно, молекулярная масса белка может быть определена калибровкой ДСН-ПАГ, и наличие единичной полосы в геле является критерием чистоты белка.

Однако модификации полипептидной цепи, например, *N*- или *O*-гликозидными, приводят к значительной смене средней молекулярной массы белка, так как ДСН не связывается с карбогидратным компонентом так, как с полипептидным. В этом случае постоянное отношение заряда к молекулярной массе не сохраняется. Средняя молекулярная масса белков, подвергнутых посттрансляционной модификации, не является подлинным отображением массы полипептидной цепи.

ВОССТАНОВЛЕННЫЕ УСЛОВИЯ

Состав и тримерная структура белков часто поддерживаются присутствием дисульфидных связей. Целью ДСН-ПАГ испытаний в восстановленных условиях является разрушение структуры белка восстановлением дисульфидных связей. Полная денатурация и диссоциация белков обработкой 2-меркаптоэтанолом или дитиотреитолом (ДТТ) приводит к развертыванию полипептидной цепи и дальнейшему комплексообразованию с ДСН. В этих условиях молекулярную массу полипептидных субъединиц можно расчитать по линейной регрессии соответствующего стандарта молекулярных масс.

НЕВОССТАНОВЛЕННЫЕ УСЛОВИЯ

Для ряда испытаний полная диссоциация белка на субъенидичные пептиды невозможна. Из-за отсутствия восстанавливающих агентов, таких как 2-меркаптоэтанол или ДТТ, дисульфидные ковалентные связи становятся недоступными, сохраняя олигомерную форму белка. Олигомерные ДСН-белковые комплексы мигрируют свободнее, чем их ДСН-полипептидные субъединицы. Кроме того, невосстановленные белки не могут быть целиком насыщены ДСН и, соответственно, поэтому не могут связывать детергент с постоянным соотношением масс. Это делает молекулярно-массовое определение этих молекул с помощью ДСН-ПАГ неадекватным в сравнении с анализом полностью денатурированных полипептидов, так как необходимо наличие стандартов, которые имеют идентичную с испытуемым неизвестным белком конфигурацию для адекватного сравнения. Напротив проявление одной полосы в таком геле является критерием чистоты белка.

СВОЙСТВА ЭЛЕКТРОФОРЕЗА В ГЕЛЕ С ПРЕРЫВИСТОЙ БУФЕРНОЙ СИСТЕМОЙ

Наиболее широко используемый электрофоретический метод исследования сложных белковых смесей включает использование прерывистой буферной системы, который состоит из двух гелей: разрешающего или разделяющего (нижнего) геля и концентрирующего (верхнего) геля. Два геля отличаются пористостью, pH и ионной силой. Кроме того, используются разные по подвижности ионы в геле и электродных буферах. Буферная прерывистость приводит к концентрации большого объема образцов в концентрирующем геле и улучшению их разделения. При прохождении тока через испытуемый раствор падает напряжение, что вносит белки в концентрирующий гель. Ионы глицината с электродного буфера движутся за белками в концентрирующий гель. Быстро образуется область подвижной границы с высокоподвижными ведущими хролид-ионами и относительно медленными замыкающими ионами глицината. Образуется локализованный высоковольтный градиент между фронтами лидирующих и отстающих ионов, заставляя ДСН-белковые комплексы формировать тонкие зоны (полосы) и мигрировать между фазами хлорида и глицината. В широких границах, независимо от высоты нанесенного образца, все ДСН-белки конденсируются в очень узкую область и движутся к разделяющему гелю в виде четко определяемой тонкой зоны с высокой плотностью белка. Крупнопористый концентрирующий гель не задерживает миграцию большинства белков и, в основном, служит антиконвекторной средой.

На поверхности как концентрирующего, так и разделяющего гелей белки встречаются с резким возрастанием эффекта задерживания вследствие ограниченного размера пор разделяющего геля. Одновременно движение белков разделяющего геля продолжает замедляться вследствие ситовых свойств матрицы. Ионы глицината догоняют белки, а затем передвигаются в пространстве с постоянным pH, образованным трис(гидроксиметил)аминометаном и глицином. Молекулярно-ситовые свойства фазы приводят к разделу ДСН-полипептидных комплексов по их молекулярным массам.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ВЕРТИКАЛЬНЫХ ПРЕРЫВИСТО-БУФЕРНЫХ ДСН-ПОЛИАКРИЛАМИДНЫХ ГЕЛЕЙ

Составление кассет, формирующих гель. Две стеклянные пластинки (например, размером 10 см х 8 см), политетрафторэтиленовую гребенку, две прокладки и силиконовые трубки (например, диаметром 0.6 мм и длиной 35 см) моют с мягким детергентом и ополаскивают водой. Все указанное сушат бумажным полотенцем или тканью. Прокладки и трубки смазывают несиликоновым маслом. Прокладки укладывают вдоль двух коротких сторон стеклянных пластин на расстоянии 2 мм от их краев и 2 мм от длинной стороны, являющейся дном геля. Используя одну прокладку в качестве основы, начинают укладывать трубку. Осторожно просовывают трубку к низу прокладки и протягивают вдоль длинной стороны стеклянной пластинки. Придерживая трубку вдоль длинной стороны пластинки, укладывают трубку по короткой стороне стеклянной пластинки, используя прокладку в качестве направляющей. Накрывают другой стеклянной пластинкой, плотно прижимая кассету руками. Устанавливают по два зажима на две короткие стороны кассеты. Осторожно устанавливают четыре зажима на длинную сторону кассеты геля, формируя дно кассеты. Необходимо удостовериться, чтобы трубка проходила вдоль края стеклянной пластинки и нигде не выдавливалась при размещении зажимов. Кассета готова для заливания гелем.

Приготовление геля. В случае прерывистого буферного ДСН-полиакриламидного геля рекомендуется залить разделительный гель, дождаться его полимеризации и затем залить концентрирующий гель, поскольку гели отличаются содержанием акриламида-бисакриламида, буфером и рН.

Приготовление разделительного геля. В конической колбе готовят соответствующий объем раствора с необходимой концентрацией акриламида для формирования геля, используя указания, приведенные в Табл. 2.2.31.-1. Компоненты смешивают в указанной последовательности. Если необходимо, перед прибавлением раствора аммония персульфата и тетраметилэтилендиамина (ТЕМЭД) раствор фильтруют под вакуумом сквозь ацетатцеллюлозную мембрану (диаметр пор 0.45 мкм); раствор выдерживают под вакуумом, взбалтывая фильтрационное приспособление до окончания образования в растворе пузырьков. Прибавляют соответствующее количество раствора аммония персульфата и ТЕМЭД, как указано в Табл. 2.2.31.-1, взбалтывают и сразу заливают в пространство между двумя пластинками кассеты. Оставляют необходимое место для формирующего геля (к длине зубца гребеня прибавляют 1 см). Используя заостренную стеклянную пипетку, осторожно наслаивают насыщенный водой раствор изобутанола. Гель выдерживают в вертикальном положении при комнатной температуре до полимеризации.

Таблица 2.2.31.-1

Приготовление разделительного геля

Компоненты раствора	**Объемы компонента (мл) на 1 кассету геля вместимостью**							
	5мл	10мл	15мл	20мл	25мл	30мл	40мл	50мл
6% акриламид								
Вода Р	2,6	5,3	7,9	10,6	13,2	15,9	21,2	26,5
Раствор акриламида (1)	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	8,0	10,0
1.5М Трис (рН 8.8) (2)	1,3	2,5	3,8	5,0	6,3	7,5	10,0	12,5
Раствор 100 г/л ДСН (3)	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
Раствор 100 г/л АПС (4)	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
ТЕМЭД (5)	0,004	0,008	0,012	0,016	0,02	0,024	0,032	0,04
8% акриламид								
Вода Р	2,3	4,6	6,9	9,3	11,5	13,9	18,5	23,2
Раствор акриламида (1)	1,3	2,7	4,0	5,3	6,7	8,0	10,7	13,3
1.5М Трис (рН 8.8) (2)	1,3	2,5	3,8	5,0	6,3	7,5	10,0	12,5
Раствор 100 г/л ДСН (3)	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
Раствор 100 г/л АПС (4)	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
ТЕМЭД (5)	0,003	0,006	0,009	0,012	0,015	0,018	0,024	0,03
10% акриламид								
Вода Р	1,9	4,0	5,9	7,9	9,9	11,9	15,9	19,8
Раствор акриламида (1)	1,7	3,3	5,0	6,7	8,3	10,0	13,3	16,7
1.5М Трис (рН 8.8) (2)	1,3	2,5	3,8	5,0	6,3	7,5	10,0	12,5
Раствор 100 г/л ДСН (3)	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
Раствор 100 г/л АПС (4)	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
ТЕМЭД (5)	0,002	0,004	0,006	0,008	0,01	0,012	0,016	0,02
12% акриламид								
Вода Р	1,6	3,3	4,9	6,6	8,2	9,9	13,2	16,5
Раствор акриламида (1)	2,0	4,0	6,0	8,0	10,0	12,0	16,0	20,0

1.5M Трис (pH 8.8) (2)	1,3	2,5	3,8	5,0	6,3	7,5	10,0	12,5
Раствор 100 г/л ДСН (3)	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
Раствор 100 г/л АПС (4)	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
ТЕМЭД (5)	0,002	0,004	0,006	0,008	0,01	0,012	0,016	0,02
14% акриламид								
Вода Р	1,4	2,7	3,9	5,3	6,6	8,0	10,6	13,8
Раствор акриламида (1)	2,3	4,6	7,0	9,3	11,6	1,.9	18,6	23,2
1.5M Трис (pH 8.8) (2)	1,2	2,5	3,6	5,0	6,3	7,5	10,0	12,5
Раствор 100 г/л ДСН (3)	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
Раствор 100 г/л АПС (4)	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
ТЕМЭД (5)	0,002	0,004	0,006	0,008	0,01	0,012	0,016	0,02
15% акриламид								
Вода Р	1,1	2,3	3,4	4,6	5,7	6,9	9,2	11,5
Раствор акриламида (1)	2,5	5,0	7,5	10,0	12,5	15,0	20,0	25,0
1.5M Трис (pH 8.8) (2)	1,3	2,5	3,8	5,0	6,3	7,5	10,0	12,5
Раствор 100 г/л ДСН (3)	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
Раствор 100 г/л АПС (4)	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
ТЕМЭД (5)	0,002	0,004	0,006	0,008	0,01	0,012	0,016	0,02

(1) Раствор акриламида: *30% раствор акриламида/бисакриламида (29:1) Р*.
(2) 1.5M Трис (pH 8.8): *1.5M буферный раствор трис-гидрохлорида pH 8.8 Р*.
(3) Раствор 100 г/л ДСН: раствор 100 г/л *натрия додецилсульфоната Р*.
(4) Раствор 100 г/л АПС: раствор 100 г/л *аммония персульфата Р*. Аммония персульфат доставляет свободные радикалы, которые ускоряют полимеризацию акриламида и бисакриламида. Поскольку раствор аммония персульфата разлагается, следует готовить еженедельно свежие растворы
(5) ТЕМЭД: *тетраметилэтилендиамин Р*.

Приготовление концентрирующего геля. После завершения полимеризации (около 30 минут) сливают изобутанол и промывают верхнюю поверхность геля несколько раз водой для удаления нанесенного изобутанола и каких-либо неполимеризованных излишек акриламида. Удаляют как можно больше жидкости с поверхности геля при помощи кончика бумажной салфетки.

В конической колбе готовят соответствующий объем концентрирующего геля с необходимой концентрацией акриламида, используя значения, указанные в Табл. 2.2.31.-2. Компоненты смешивают в обозначенной последовательности. Если необходимо, перед прибавлением раствора аммония персульфата и ТЕМЭД раствор фильтруют под вакуумом сквозь ацетатцеллюлозную мембрану (диаметр пор 0.45 мкм); раствор выдерживают под вакуумом, взбалтывая фильтрационное приспособление до окончания образования в растворе пузырьков. Прибавляют соответствующее количество раствора аммония персульфата и ТЕМЭД, как указано в Табл. 2.2.31.-2, взбалтывают (встряхивают вращательными движениями) и сразу заливают в пространство между двумя пластинками кассеты прямо на поверхность полимеризованного разделительного геля. В раствор концентрирующего геля сразу вкладывают чистый политетрафторэтиленовый гребень для избежания появления воздушных пузырьков. Прибавляют еще раствор концентрирующего геля до полного заполнения пространства гребня. Гель выдерживают в вертикальном положении при комнатной температуре до полимеризации.

Таблица 2.2.31.-2

Приготовление концентрирующего геля

Компоненты раствора	**Объемы компонента (мл) на 1 кассету геля вместимостью**							
	1мл	2мл	3мл	4мл	5мл	6мл	8мл	10мл
Вода Р	0,68	1,4	2,1	2,7	3,4	4,1	5,5	6,8

Раствор акриламида [(1)]	0,17	0,33	0,5	0,67	0,83	1,0	1,3	1,7
1.0М Трис (рН 6.8) [(2)]	0,13	0,25	0,38	0,5	0,63	0,75	1,0	1,25
Раствор 100 г/л ДСН [(3)]	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,08	0,1
Раствор 100 г/л АПС [(4)]	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,08	0,1
ТЕМЭД [(5)]	0,001	0,002	0,003	0,004	0,005	0,006	0,008	0,01

(1) Раствор акриламида: *30% раствор акриламида/бисакриламида (29:1) Р*.

(2) 1.0М Трис (рН 6.8): *1.5М буферный раствор трис-гидрохлорида рН 6.8 Р*.

(3) Раствор 100 г/л ДСН: раствор 100 г/л *натрия додецилсульфоната Р*.

(4) Раствор 100 г/л АПС: раствор 100 г/л *аммония персульфата Р*. Аммония персульфат доставляет свободные радикалы, которые ускоряют полимеризацию акриламида и бисакриламида. Поскольку раствор аммония персульфата разлагается, следует готовить еженедельно свежие растворы

(5) ТЕМЭД: *тетраметилэтилендиамин Р*.

Сборка электрофоретического прибора и проведение электрофоретического разделения. После завершения полимеризации (около 30 минут) осторожно удаляют политетрафторэтиленовый гребень. Сразу ополаскивают стенки водой или *буферным рабочим раствором для электрофореза в системе ДСН-ПАГ Р* для удаления излишков неполимеризованного акриламида. При необходимости поправляют выступ концентрирующего геля тупой гиподермичной иголкой, надетой на шприц. Снимают зажимы с одной короткой стороны, осторожно вытягивая трубку. Аналогично снимают зажимы с другой короткой стороны. Затем удаляют трубку со дна геля. Помещают гель в электрофоретичный прибор. Верхний и нижний резервуары наполняют буфером для электрофореза. Удаляют все пузырьки, образующиеся на поверхности геля между двумя стеклянными пластинками. Для этих целей лучше всего использовать иголку, надетую на шприц. Не следует проводить первоначальный электрофорез до нанесения образцов, так как это приведет к нарушению непрерывности буферной системы. Перед нанесением образцов осторожно ополаскивают отверстие *буфрным рабочим раствором для электрофореза в системе ДСН-ПАГ Р.* Готовят испытуемые растворы и растворы сравнения в рекомендованном буфере для образцов и обрабатывают, как указано в частной статье. Наносят необходимое количество каждого раствора в карманы концентрирующего геля. Начинают электрофорез в условиях, указанных в инструкции к прибору. Изготовители ДСН-ПАГ приборов могут поставлять гели разных размеров и толщины. Для получения оптимального разделения необходимо подбирать время проведения электрофореза, а также силу тока/напряжения соответственно с указанием изготовителя приборов.

Необходимо удостовериться, что окрашенный фронт доходит до разделительного геля. Когда краситель доходит до нижнего края геля, электрофорез заканчивают. Кассету геля вынимают из прибора и отделяют стеклянные пластинки. Вытаскивают прокладки, отрезают, отделяют концентрирующий гель и окрашивают полученный гель.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ В ГЕЛЯХ

Наиболее широко применяется метод окрашивания белков красителем Кумасси (# кислотный синий 92), позволяющий определить от 1 мкг до 10 мкг белков в одной полосе. Окрашивание серебром – наиболее чувствительный метод для окрашивания белков в гелях, при этом определяются полосы, содержащие от 10 нг до 100 нг белка.

Все стадии окрашивания геля проводят при комнатной температуре, осторожно встряхивая (например, на платформе шейкера) в подходящей посуде. При окрашивании гелей необходимо надевать рукавицы, так как на геле остаются отпечатки пальцев.

Краска Кумасси. Гель погружают в большой объем *раствора краски Кумасси Р*, выдерживают продолжительностью не менее 1 часа. Затем сливают раствор для окрашивания.

Гель обесцвечивают большим объемом *обесцвечивающего раствора Р*. Обесцвечивающий раствор меняют несколько раз до четкого проявления белковых полос на прозрачном фоне. Чем тщательнее обесцвечивают гель, тем меньшее количество белков можно найти этим методом. Обесцвечивание можно ускорить использованием нескольких граммов анионобменной смолы или маленькой губки, смоченной *обесцвечивающим раствором Р*.

ПРИМЕЧАНИЕ. Кислотно-спиртовые растворы, используемые в указанных методиках, не полностью фиксируют белки в геле. Это может привести к потерям некоторых низкомолекулярных белков в процессе окрашивания и обесцвечивания тонких гелей. Стойкая фиксация обеспечивается выдерживанием геля в смеси трихлоруксусная кислота Р – метанол Р – вода Р (1:4:5) в течение 1 часа перед погружением геля в раствор краски Кумасси Р.

Окрашивание серебром. Гель погружают в большой объем *фиксирующего раствора Р* и выдерживают продолжительностью 1 час. Фиксирующий раствор сливают, гель заливают свежим фиксирующим раствором и выдерживают продолжительностью не менее 1 часа и, если возможно, оставляют на ночь. Фиксирующий раствор сливают и гель промывают большим объемом *воды Р* в течение 1 ч. Затем гель выдерживают в растворе 1% *(об/об) глутарового альдегида Р* в течение 15 мин, дважды промывают большим объемом воды Р, каждый раз продолжительностью 15 минут, помещают в свежеприготовленный *реактив серебра нитрата Р* и выдерживают по 15 мин в темном месте. Затем трижды промывают большим объемом *воды Р*, каждый раз по 5 мин. Гель выдерживают в растворе *проявителя Р* около 1 минуты до достаточного окрашивания. Проявление останавливают, помещая гель в *блокирующий растор Р* на 15 мин. Ополаскивают гель *водой Р*.

ВЫСУШИВАНИЕ ОКРАШЕННЫХ ДСН-ПОЛИАКРИЛАМИДНЫХ ГЕЛЕЙ

Гели высушивают в зависимости от использованного метода окрашивания. Кумасси-окрашенные гели после стадии обесцвечивания выдерживают в растворе 100 г/л *глицерина Р* в течение 2 ч (возможно инкубирование на ночь). При окрашивании серебром на конечной стадии ополаскивания выдерживают гель в растворе 20 г/л *глицерина Р* в течение 5 мин.

Два листа пористой целлюлозной пленки погружают в *воду Р* и выдерживают от 5 до 10 мин. Один из листов помещают на рамку высушивания, осторожно наносят на него гель, удаляют воздушные пузырьки и наносят несколько миллилитров *воды Р* по краям геля, накрывают другим листом, удаляют воздушные пузырьки и завершают сборку рамки высушивания. Рамку помещают в сушилку и оставляют при комнатной температуре до высушивания геля.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССЫ

Молекулярную массу белков определяют, сравнивая их подвижность с известными белками известной молекулярной массой. Имеются заранее смешанные смеси белков с известными и разными интервалами молекулярных масс для равномерного окрашивания и калибрования гелей. Концентрированные растворы белков с известной молекулярной массой разводят соответствующим буферным раствором для образцов и наносят на тот же гель, что и испытуемый белок.

Сразу после проведения электрофореза определяют электрофоретический фронт красителя бромфенолового синего. Это можно сделать нанесением насечки на край геля или введением иголки, смоченной индигокармином на фронт красителя. После окрашивания измеряют расстояние миграции каждой белковой полосы (известных и неизвестных) от края разделительного геля. Расстояние передвижения каждого белка делят на расстояние, пройденное сопутствующим красителем. Полученные результаты передвижения называются относительной подвижностью белков (относительно фронта красителя) и условно обозначаются R_f. Строят график зависимости логарифма относительных молекулярных масс (*М.м.*) белковых стандартов от условно полученных значений R_f. Обычно график имеет слегка сигмовидную форму. Неизвестные молекулярные массы определяют методом линейной регрессии интерполяцией графика зависимости log *М.м.* от R_f., если значения, полученные для неизвестных образцов, располагаются на линейной части графика.

ВАЛИДАЦИЯ ИСПЫТАНИЯ

Результаты испытания признаются достоверными если молекулярные массы известных белков расположены вдоль 80% длины геля и по всей области необходимого деления (то есть, области, покрывающей образец и его димеры или образец и сопровождающие примеси), разделение соответствующих белковых полос проявляет линейную зависимость логарифма молекулярной массы от R_f. Дополнительные условия к валидации по отношению к испытуемым растворам указываются в частной статье.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРИМЕСЕЙ

Если в частной статье указывают предел содержания примесей, в испытании необходимо использовать раствор сравнения соответствующего разведения. Например, если предел содержания примесей составляет 5%, необходимо использовать раствор сравнения, разведенный по отношению к испытуемому раствору в соотношении 1:20. На электрофореграмме испытуемого раствора ни одна примесь (ни одна полоса, кроме основной) не должна быть интенсивнее основной полосы на электрофореграмме раствора сравнения.

Для валидированной методики содержание примесей может определяться методом внутренней нормализации по отношению к основной полосе с использованием интегрирующего денситометра. При валидации методики необходимо подтвердить линейность сигнала.

2.2.32. ПОТЕРЯ В МАССЕ ПРИ ВЫСУШИВАНИИ

Определение потери в массе при высушивании проводят одним из приведенных способов и выражают в процентах *(масса/масса).*

Методика. Указанное в частной статье количество испытуемого вещества помещают во взвешенный бюкс, предварительно высушенный в условиях, описанных для испытуемого вещества. Вещество сушат до постоянной массы или в течение времени, указанного в частной статье, одним из следующих способов:

а) «*в эксикаторе*»: высушивание проводят над *фосфора (V) оксидом Р* при атмосферном давлении и комнатной температуре;

б) «*в вакууме*»*:* высушивание проводят над *фосфора (V) оксидом Р* при давлении от 1,5 кПа до 2,5 кПа и комнатной температуре;

в) «*в вакууме*» в пределах указанного температурного интервала: высушивание над *фосфора (V) оксидом Р* при давлении от 1,5 кПа до 2,5 кПа и температуре, указанной в частной статье;

с) «в пределах указанного температурного интервала»: высушивание в сушильном шкафу при температурном интервале, указанном в частной статье;

д) «в глубоком вакууме»: высушивание над *фосфора (V) оксидом Р* при давлении не более 0,1 кПа и температуре, указанной в частной статье.

Если указаны иные условия, используемая методика полностью описывается в частной статье.

2.2.33. СПЕКТРОМЕТРИЯ ЯДЕРНОГО МАГНИТНОГО РЕЗОНАНСА

Спектрометрия ядерного магнитного резонанса (ЯМР) основана на существовании постоянного магнитного момента ядер ^{1}H, ^{13}C, ^{19}F, ^{31}P. Во внешнем магнитном поле (основное поле) такие ядра приобретают целиком определенную ориентацию по отношению к направлению этого поля; ориентация вектора магнитного момента атома соответствует определенным уровням энергии. При заданном напряжении поля переходы между соседними энергетическими уровнями происходят вследствие поглощения электромагнитного излучения характеристических длин волн в диапозоне радиочастот.

Соответствующие частоты могут быть найдены или путем последовательного поиска резонансных положений (непрерывная спектрометрия), или путем одномоментного возбуждения всех возможных переходов многочастотным импульсом с дальнейшей компьютерной обработкой спада свободной индукции излучения, которая удаляется системой при возврате в основное положение (импульсная спектрометрия).

Спектр *протонного* магнитного резонанса представляет собой набор сигналов, которые соответствуют протонам и характеризуют их ядерное и электронное окружение в молекуле. Сдвиг частоты данного сигнала относительно сигнала стандартного вещества называется химическим сдвигом (δ) и выражается в миллионных долях (ppm); химический сдвиг характеризует протон в зависимости от его электронного окружения. Сигналы часто расщепляются на группы родственных пиков, называемых дуплетами, триплетами, квартетами…

мультиплетами. Это обусловлено присутствием постоянных магнитных полей, вызванных соседними ядрами, особенно других протонов, расположенных в радиусе двух-пятивалентных связей. Интенсивность сигнала, который определяется как площадь под соответствующей кривой, пропорциональна числу эквивалентных протонов.

Прибор. ЯМР-спектрометр для спектрометрии непрерывного действия состоит из магнита, генератора низкочастотного разрешения, держателя образца, радиочастотных выпрямителей и приемника, регистрирующего устройства и электронного интегратора. Импульсный спектрометр снабжается кроме этого импцульсным выпрямителем и компьютером для сбора, хранения и математического преобразования данных к спектру обычного вида.

Используются ЯМР-спектрометры, которые работают при частоте не менее 60 МГц для ^{1}H. Если отсутствуют специальные указания, руководствуются инструкцией изготовителя. Прежде чем проводить регистрацию спектра, необходимо убедиться, что:

1. Разность равна не более 0,5 Гц; для этого измеряют при подходящем масштабе шкалы ширину пика на половине высоты; или полосу δ 7,33 ppm симметричного мультиплета раствора 20% (*об/об*) *дихлорбензола Р* в *дейтерированном ацетоне Р*; или полосы при δ 7,51 ppm раствора 5% (*об/об*) *тетраметилсилана Р* в *дейтерированном хлороформе Р*.

2. Отношение сигнал/шум (S/N), измеренное в диапозоне от δ 2 ppm до δ 5 ppm для спектра раствора 1% (*об/об*) *этилбензола Р* в *дейтерированном хлороформе Р* составляет как минимум 25:1. Эти отношения расчитываются как среднее из пяти последовательных измерений по формуле:

$$\frac{S}{N} = 2{,}5\frac{A}{H},$$

где:

A – амплитуда, в милиметрах, наибольшего из пиков метиленового квартета этилбензола с центром при δ 2,65 ppm. Амплитуду измеряют от базовой линии, что образуется от центра области шума с какой-нибудь из сторон квартета на расстоянии как минимум 1 ppm от этого центра;

H – полная амплитуда шума базовой линии, в милиметрах, между δ 4 ppm и δ 5 ppm.

3. Амплитуда боковых полос, обусловленных вращением, не превышает 2% высоты пика образца при соответствующей данному пику спектрометра скорости вращения ампулы с образцом.

4. При проведении количественных измерений проверяют воспроизводимость сигналов интегратора, используя раствор 5% (*об/об*) *этилбензола Р* в *дейтерированном хлороформе Р*. Проводят пять измерений для протонов этильных групп и расчитывают среднее значение. Ни один из измеренных результатов не должен отличаться от среднего более чем на 2,5%.

Методика. Испытуемый образец растворяют, как указано в частной статье, и фильтруют; раствор должен быть прозрачным. Для определения химического сдвига используют внутренний стандарт. Если нет других указаний, в качестве внутреннего стандарта используют или раствор (от 0,5% (*об/об*) до 1,0% (*об/об*)) *тетраметилсилана Р* (ТМС) в тейтерированных органических растворителях, или раствор от 5 г/л до 10 г/л *натрия тетрадейтеродиметилсилапентаноата Р* в *дейтерия оксиде Р*. Подбирают необходимое количество и проводят регистрацию спектра.

СПЕКТРОСКОПИЯ НЕПРЕРЫВНОГО ДЕЙСТВИЯ

Прибор настраивают к работе настолько близко к модели чистого поглощения, насколько это возможно, используя также радиочастотную настройку, что позволяет избежать насыщения сигналов. Чувствительность спектрометра регулируют таким образом, чтобы наибольший из пиков в спектре испытуемого вещества занимал практически всю шкалу регистрирующего приспособления и чтобы сигнал внутреннего стандарта соответствовал химическому сдвигу δ 0,00 ppm. Регистрируют спектр в указанной области при разрешающей скорости не более 2 Гц/с, если нет других указаний в частной статье. Снимают интегральный спектр в той же области при подходящей разрешающей скорости в зависимости от используемого спектрометра. Количественные измерения проводятся так, как указано в частной статье.

ИМПУЛЬСНАЯ СПЕКТРОМЕТРИЯ

Параметры спектрометра, например, угол вращения, амплитуда импульса, интервал между импульсами, спектральная ширина, число экспериментальных точек и скорость поступления данных в компьютер, определяются соответственно инструкцией изготовителя прибора, и регистрируется спад свободной индукции необходимое число раз. После математической компьютерной обработки данных регулятор фазы устанавливают таким образом, чтобы получить при возможности чистый спектр поглощения, и калибруют спектр по отношению резонансной к чистоте химического сдвига внутреннего стандарта. Спектр, сохраняемый в компьютере, выводят на подходящее приспособление и в случае количественных измерений обсчитывают интеграл с учетом возможностей прибора.

2.2.34. ТЕРМОГРАВИМЕТРИЯ

Термический анализ объединяет группу методов, при помощи которых определяется зависимость различных физических свойств веществ от

температуры. Обычно в большинстве используемых методов определяют изменение энергии или массы испытуемого образца.

Характерной особенностью термических методов анализа является их универсальность. Инструментальные методы термического анализа дают информацию о кристаллической структуре, температуре кипения, способности к сублимации, дегидратации, твердофазном взаимодействии. Эта информация может быть использована для идентификации, определения чистоты, влажности и стабильности веществ, количественного определения термонестойких веществ, выявления присутствия полиморфных форм, для характеристики совместимости субстанций и вспомогательных веществ в лекарственных средствах, выбора упаковки и контроля качества.

Различают термогравиметрию, термометрическое титрование, дифференциальный термический анализ, дифференциальную отраженную колориметрию, дериватографию, термомикроскопию.

Термические методы анализа, как правило, не требуют больших количеств веществ, непродолжительны по времени выполнения. В частности, определение потери в массе при высушивании методом *термогравиметрии* включают в частные статьи на дорогие субстанции. В частных статьях следует указывать параметры, необходимые для корректного выполнения методики, например: скорость и температуру нагревания, инертный газ и скорость его потока.

Термогравиметрия представляет собой метод, при помощи которого регистрируют изменение массы испытуемого образца от программированного изменения температуры.

Прибор. Основными составляющими частями прибора являются: приспособление для нагревания или охлаждения вещества соответственно заданной температурной программы, камера для образца с контролируемой атмосферой, электровесы и регистрирующее устройство. К прибору может быть присоединено приспособление для анализа летучих веществ.

Проверка температурной шкалы. Проверку температурной шкалы проводят в соответвии с инструкцией изготовителя с использованием никеля или другого подходящего материала.

Градуировка весов. Подходящее количество ФСО *кальция оксалата моногидрата* помещают в контейнер и регистрируют его массу. Начинают нагревание образца по программированному изменению температуры соответственно инструкции изготовителя. Термогравиметрическую кривую регистрируют в виде графика: показания температуры откладывается по оси абсцис по возрастанию значений слева направо; показания массы откладывается по оси ординат по возрастанию значений снизу вверх. При температуре около 230°С повышение температуры приостанавливают. На графике измеряют расстояние между начальным и конечным плато, что соответствует изменению массы образца.

Полученную величину сопоставляют с величиной, указанной в маркировке *кальция оксалат моногидрат* ФСО.

Методика. Изменение массы испытуемого образца определяют в условиях, указанных в частной статье. Потерю в массе испытуемого образца определяют измеряя расстояние между начальным и конечным плато на гравиметрической кривой и выражают в процентах (*м/м*).

При регулярном использовании прибора периодически проводят градуировку и проверку температурной шкалы.

2.2.35. ОСМОЛЯЛЬНОСТЬ

Осмоляльность — это показатель, позволяющий оценить суммарный вклад различных растворенных веществ в осмотическое давление раствора. Приближенный расчет осмоляльности ξ_m водного раствора проводят по формуле:

$$x_m = Jm\Phi$$

где:

J — суммарное число ионов, образующихся из одной молекулы растворенного вещества в результате диссоциации. В случае, если растворенное вещество не диссоциирует на ионы, J = 1;

m — моляльность раствора, т.е. число молей растворенного вещества на килограмм растворителя;

Ф — моляльный осмотический коэффициент, учитывающий взаимодействие между ионами противоположного знака в растворе и зависящий от величины *m.* По мере усложнения состава раствора усложняется и определение величины *Ф*.

Единицей осмоляльности является осмоль на килограмм растворителя (осмоль/кг), но на практике обычно используется единица миллиосмоль на килограмм растворителя (мосмоль/кг).

Осмоляльность определяют по понижению температуры замерзания раствора, если нет других указаний в частной статье. Зависимость между осмоляльностью и понижением температуры замерзания ΔT выражают соотношением:

$$x_m = \frac{\Delta T}{1{,}86} \cdot 100 \text{мосмоль/кг}$$

Прибор. Составными частями прибора (осмометра) являются:

— приспособление для охлаждения сосуда с измерительной кюветой;

— система для измерения температуры, состоящая из чувствительного к температуре сопротивления (термистора) с соответствующим устройством для измерения тока или разности потенциалов. Измерительное устройство может быть градуировано в градусах понижения температуры или непосредственно в единицах осмоляльности;

— как правило, приспособление для перемешивания образца.

Методика. Готовят стандартные растворы в соответствии с таблицей 2.2.35.-1.

Таблица 22.2.35.-1.

Стандартные растворы для калибровки осмометра

Масса *натрия хлорида Р*, в граммах на килограмм *воды Р*	Фактическая осмоляльность (мосмоль/кг)	Теоретическая осмоляльность идеального раствора (мосмоль/кг)	Моляльный осмотический коэффициент	Криоскопическое понижение температуры (°С)
3,087	100	105,67	0,9463	0,186
6,260	200	214,20	0,9337	0,372
9,463	300	323,83	0,9264	0,558
12,684	400	434,07	0,9215	0,744
15,916	500	544,66	0,9180	0,930
19,147	600	655,24	0,9157	1,116
22,380	700	765,86	0,9140	1,302

Устанавливают нулевое значение на шкале прибора, используя *воду Р*. Проводят градуировку прибора, используя стандартные растворы: помещают от 50 мкл до 250 мкл стандартного раствора в измерительную ячейку и начинают охлаждение системы. Чтобы предотвратить переохлаждение, измерительное устройство, как правило, программируют на работу при температурах более низких, чем ожидаемое криоскопическое понижение температуры.

Соответствующее устройство указывает на достижение равновесия. Перед каждым измерением ячейку ополаскивают соответствующим стандартным раствором.

Те же операции проводят с испытуемым раствором. При этом перед каждым измерением кювету ополаскивают испытуемым раствором. Результаты либо непосредственно определяют по шкале прибора, либо рассчитывают по измеренному понижению температуры замерзания. Результаты считают достоверными, если полученное значение осмоляльности испытуемого раствора не выходит за пределы значений осмоляльности двух стандартных растворов, использованных для калибровки.

Наряду с понятием «осмоляльность» в практике используется понятие «осмолярность». Аналогично осмоляльности осмолярность - показатель, позволяющий оценить суммарный вклад различных растворенных веществ в осмотическое давление раствора.

Данные показатели близки и отличаются друг от друга только различным способом выражения концентрации растворов — моляльной и молярной.

Осмоляльность — количество осмолей на 1 кг растворителя;

Осмолярность — количество осмолей на 1 л раствора.
Для идеальных растворов масса осмоля, в граммах, представляет собой отношение грамм-молекулярной массы вещества к числу частиц или ионов, образующихся при его растворении.

Для разбавленных растворов, близких к идеальным, осмоляльность и осмолярность могут быть рассчитаны теоретически.

Осмолярность идеальных растворов может быть рассчитана по формуле:

$$Осмолярность = \frac{концентрация\ вещества \cdot количество\ частиц}{молекулярная\ масса},$$

где:

концентрация вещества - количество растворенного вещества на литр раствора, в граммах;

количество частиц — число частиц или ионов, образующихся при растворении одной молекулы вещества.

Единицей осмолярности является осмоль на литр раствора (осмоль/л), но на практике обычно используется единица миллиосмоль на литр раствора (мосмоль/л).

При повышении концентрации раствора взаимодействие между частицами вещества возрастает и фактическая осмолярность понижается по сравнению с осмолярностью идеального раствора. Теоретический расчет осмолярности растворов веществ с большой молекулярной массой (например, белковых гидролизатов) и высококонцентрированных растворов невозможен. В таких случаях определяют осмоляльность экспериментальным путем по понижению температуры замерзания раствора или по понижению давления пара над раствором. Понижение температуры замерзания на 1.86°C и понижение давления пара на 0.3 мм рт.ст. при температуре 25°C соответствует 1 осмолю на килограмм воды.

Растворы, равные по осмоляльности (осмолярности) 0.9 % раствору натрия хлорида, называют изотоничными.

Наряду с прибором, описанным выше, для определения осмоляльности могут использоваться также осмометры, основанные на измерении давления пара над раствором. Они требуют малого объема вводимой пробы (около 5 мкл), при этом точность и правильность определения сравнима с величинами, получаемыми на приборах, основанных на измерении температуры замерзания.

В осмометрах, основанных на измерении понижения температуры замерзания, объем вводимой пробы образца можно варьировать.

Указание значения осмоляльности (осмолярности) в маркировке препаратов. Значение осмоляльности (осмолярности) необходимо указывать на этикетках инфузионных растворов.

2.2.36. ПОТЕНЦИОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ИОНОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИОНСЕЛЕКТИВНЫХ ЭЛЕКТРОДОВ

Теоретически потенциал *E* ионселективного электрода изменяется линейно от логарифма активности a_i данного иона, что выражается уравнением Нернста:

$$E = E_o + 2{,}303 \frac{RT}{z_i F} \log a_i ,$$

где:

E_o – стандартный электродный потенциал используемого электрода;

R – универсальная газовая постоянная;

T – абсолютная температура;

F – число Фарадея;

z_i – величина заряда иона с обозначением его знака.

При постоянной ионной силе выполняется уравнение:

$$E = E_o + \frac{k}{z_i}\log fC_i \ ,$$

где:

C_i – молярная концентрация иона;

f – коэффициент активности (a_i = fC_i);

$$k = \frac{RT}{F}$$

если:

$$E_o + \frac{k}{z_i}\log f = E_o^` \quad и \quad S = \frac{k}{z_i},$$

где:

S – наклон калибровочной кривой электрода (наклон электродной функции),

в таком случае выполняется уравнение:

$$E = E_o^` + S\log C_i \quad и \quad для \quad -\log C_i \ = pC_i \ : E = E_o^` - SpC_i$$

Потенциомтрическое определение концентрации иона проводят путем измерения разницы потенциалов между двумя подходящими электродами, погруженными в испытуемый раствор; индикаторный электрод является селективным по отношению к анализируемому иону, другой является электродом сравнения.

Прибор. Используют вольтметр, позволяющий выполнять измерения с точностью 0,1 милливольта, с входным сопротивлением в 100 раз превышающим сопротивление используемых электродов.

Ионселективные электроды – преимущественно электроды с кристаллической или некристаллической мембраной или с твердой основой (например, стеклянные электроды) или электроды с заряженными (положительно или отрицательно) или с незаряженными подвижными носителями или с сенсибилизированными электроды (субстрат-энзимные электроды, газ-индикаторные электроды). Электродом сравнения обычно являются хлорсеребряный или каломельный электрод с подходящими соединяющими жидкостями, исключающими их перемешивание.

Методика. Измерения проводят при постоянной температуре с точностью ±0,5°С, обеспечивая изменение наклона электродной функции электрода от температуры (см. Табл.2.2.36-1).

Таблица 2.2.36.1.

Значения k при разных температурах

Температура (°С)	**k**
20	0,0582

25	0,0592
30	0,0602

Ионную силу и, если необходимо, pH испытуемого раствора регулируют, используя буферные растворы, указанные в частной статье; электрод погружают в испытуемый раствор, который свободно перемешивается с постоянной скоростью и добиваются постоянства потенциала.

Если электродная система используется часто, то регулярно проверяют воспроизводимость и стабильность сигнала, линейность калибровочной кривой или расчетного алгоритма в пределах концентраций испытуемого раствора; если нет, то проводят проверку перед каждой серией измерений.

Показания электрода можно считать линейными, если наклон S калибровочной кривой приблизительно равен k/z_i на единицу pC_i.

МЕТОД I (МЕТОД ПРЯМОЙ ГРАДУИРОВКИ)

Измеряют последовательно не менее трех раз потенциалы не менее трех растворов сравнения предположительно близких концентраций к испытуемому раствору. Рассчитывают и затем строят градуировочный график в координатах: среднее значение потенциала E – соответствующее ему значение концентрации анализируемого иона, выраженное как: $-\log C_i$ или pC_i.

Приготавливают испытуемый раствор, как указано в частной статье; измеряют потенциал три раза и по среднему значению потенциала рассчитывают концентрацию анализируемого иона, используя градуировочный график.

МЕТОД II (МЕТОД МНОГОРАЗОВЫХ СТАНДАРТНЫХ ДОБАВОК)

Приготавливают испытуемый раствор, как указано в частной статье. Измеряют равновесный потенциал E_T в объеме V_T этого раствора с неизвестной концентрацией C_T анализируемого иона. Не менеее трех раз последовательно к объему V_T испытуемого раствора прибавляют объем V_S раствора сравнения, незначительный в сравнении с V_T ($V_S \leq 0{,}01\ V_T$), с концентрацией C_S, значения которой находятся в пределах линейной части градуировочного графика. После каждого прибавления измеряют потенциал и рассчитывают разницу потенциалов ΔE между измеряемым потенциалом и E_T. ΔE связано с концентрацией анализируемого иона уравнением:

$$\Delta E = S\log\left(1+\frac{C_S V_S}{C_T V_T}\right) \quad или \quad 10^{\frac{\Delta E}{S}} = 1+\frac{C_S V_S}{C_T V_T},$$

V_T – объем испытуемого раствора;

C_T – концентрация анализируемого иона в испытуемом растворе;

V_S – объем прибавляемого раствора сравнения;

C_S – концентрация анализируемого иона в растворе сравнения;

S – наклон электродной функции, установленный экспериментально при постоянной температуре путем измерения разницы потенциалов, полученной из двух растворов сравнения, концентрации которых отличаются в 10 раз и рассчитаны в пределах области градуировочного графика.

Строят график $10^{\frac{\Delta E}{S}}$ (ось y) относительно V_S (ось – x) и экстраполируют полученную линию до пересечения с осью – *x*. В точке пересечения концентрацию C_T анализируемого иона в испытуемом растворе рассчитывают по уравнению:

$$C_T = \frac{C_S V_S}{V_T},$$

при этом величина V_S соответсвует точке пересечения экстраполированной прямой с осью *x*.

МЕТОД III (МЕТОД ОДНОЙ СТАНДАРТНОЙ ДОБАВКИ)

К объему V_T испытуемого раствора, приготовленного, как указано в частной статье, прибавляют объем V_S раствора сравнения, вмещающего такое количество анализируемого иона, чтобы сигнал находился в линейной части калибровочного графика. Параллельно в тех же условиях готовят контрольный раствор. Потенциалы испытуемого раствора и контрольного раствора измеряют не менее трех раз перед прибавлением и после прибавления раствора сравнения. Рассчитывают концентрацию C_T анализируемого иона, используя уравнение с учетом необходимости коррегирования для контрольного раствора:

$$C_T = \frac{C_S V_S}{10^{\frac{\Delta E}{S}}(V_T + V_S) - V_T},$$

где:

V_T – объем испытуемого раствора или контрольного раствора;

C_T – концентрация анализируемого иона в испытуемом растворе;

V_S – объем прибавляемого раствора сравнения;

C_S – концентрация анализируемого иона в растворе сравнения;

ΔE –среднее значение разницы потенциалов, измеренных до и после прибавления объема V_S ;

S – наклон электродной функции, установлен экспериментально при постоянной температуре путем измерения разницы потенциалов, полученной из двух растворов сравнения, концентрации которых отличаются в 10 раз и рассчитаны в пределах области калибровочной кривой.

2.2.37. РЕНТГЕНОФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ СПЕКТРОМЕТРИЯ

Рентгенофлуоресцентная спектрометрия с волновой дисперсией – это метод анализа, в котором измеряют интенсивность флуоресцентного излучения, испускаемого элементом, имеющим атомный номер от 11 до 92, возбуждаемого непрерывным первичным рентгеновским излучением. Интенсивность флуоресценции элемента зависит от его концентрации в образце, а также от поглощения матрицей возбуждающего и испускаемого излучения. При следовых количествах определяемого вещества, в области линейности градуировочного

графика, измеренная при определённой длине волны интенсивность флуоресценции элемента, находящегося в матрице определённого состава, прямо пропорциональна концентрации данного элемента и обратно пропорциональна массовому коэффициенту ослабления (поглощения) матрицы при этой длине волны.

Методика. Настройку и использование прибора проводят в соответствии с инструкциями производителя. Жидкие образцы помещают непосредственно в прибор; твёрдые образцы предварительно прессуют в таблетки (гранулы), иногда после смешивания с подходящим связывающим материалом.

Для определения концентрации элемента в образце измеряют скорость счёта для нескольких стандартных образцов, содержащих известные количества данного элемента в матрицах определённого состава, и рассчитывают или измеряют массовый коэффициент ослабления матрицы анализируемого образца.

Градуировка. С помощью градуировочного раствора или серии растворов, содержащих разные концентрации определяемого элемента в различных матрицах, определяют угловой коэффициент градуировочного графика b_0 по уравнению:

$$b_0 \frac{1}{m_M} = \frac{I_C^N}{C}$$

μ_M – рассчитанный или измеренный массовый коэффициент ослабления матрицы M,

I_C^N – скорость счёта,

C – концентрация определяемого элемента в стандартном образце.

Массовый коэффициент ослабления матрицы образца. Если эмпирическая формула анализируемого образца известна, его массовый коэффициент ослабления рассчитывают исходя из справочных значений массовых коэффициентов ослабления составляющих элементов. Если элементный состав образца неизвестен, измеряют интенсивность рассеянного рентгеновского излучения I_U (Комптоновское рассеяние) и рассчитывают величину массового коэффициента ослабления матрицы образца по уравнению:

$$\frac{1}{m_{MP}} = a + bI_U$$

μ_{MP} – массовый коэффициент ослабления образца,

I_U – рассеянное рентгеновское излучение.

Определение скорости счёта для определяемого элемента в образце. Рассчитывают скорость счёта I_{EP}^N для определяемого элемента по измеренным интенсивностям флуоресцентной линии и фоновой линии (линий).

Расчёт содержания следов. Если концентрация элемента входит в область линейности градуировочного графика, её можно рассчитать по уравнению

$$C = \frac{I_{EP}^{N}}{b_0 \frac{1}{m_{MP}}} \times f$$

f = фактор разбавления.

2.2.38. УДЕЛЬНАЯ ЭЛЕКТРОПРОВОДНОСТЬ

Удельная электропроводность раствора (*k*) – величина обратная удельному сопротивлению (ρ). Удельное сопротивление определяют как отношение напряженности электрического поля к плотности тока. Сопротивление R (Ω) проводника, имеющего площадь сечения S (см^2) и длину L (см), вычисляют по формуле:

$$R = r\,\frac{L}{S}$$

Таким образом,

$$R = \frac{1}{k}\frac{L}{S} \quad \textit{или} \quad k = \frac{1}{R}\frac{L}{S}$$

Единица удельной электропроводности в системе СИ – сименс на метр (См·м$^{-1}$). На практике удельную электропроводность растворов выражают в сименсах на сантиметр (См · см$^{-1}$) или в микросименсах на сантиметр (мкСм · см$^{-1}$). Единица удельного сопротивления в системе СИ – ом-метр (Ом · м). На практике обычно используют часть единицы – ом-сантиметр (Ом · см). Если нет других указаний в частной статье, значение удельной электропроводности или удельное сопротивление обозначают для температруры 20^{o}С.

Прибор. Принцип работы используемого прибора (кондуктомера или омметра) основан на измерении удельной электропроводности столба жидкости между электродами иммерсионного измерительного приспособления (электропроводной камеры). Для избежания поляризации электродов используют переменный ток. Прибор снабжают температурным компенсатором или прецизионным термометром.

Измерительная камера вмещает два платиновых электрода, покрытых платиновой черныю, электроды с площадью поверхности S располагаются параллельно один к другому на расстоянии L. Обычно, оба электрода защищены стеклянной трубкой, обеспечивающей хороший ионный обмен между раствором и электродами.

Постоянная измерительной камеры С (см$^{-1}$) рассчитывается по формуле:

$$C = a\,\frac{L}{S},$$

где:

a – безразмерный числовой коэффициент, зависящий от конструкции камеры.

Реактивы. Готовят три стандартных раствора *калия хлорида Р*, содержащих соответственно 0,7455 г, 0,0746 г и 0,0149 г *калия хлорида Р* в 1000,0 г раствора. В качестве растворителя используют *воду, свободную от диоксида углерода, Р*,

приготовленную из *воды дистиллированной Р*, электропроводность которой не превышает 2 мкСм · $см^{-1}$.

Значения удельной электропроводности и удельного сопротивления растворов при температуре 20°С приведены в Табл. 2.2.38.1.

Таблица 2.2.38.1.

Значения удельной электропроводности и удельного сопротивления раствора калия хлорида

Концентрация г/1000,0 г раствора	**Удельная электропроводность мкСм · $см^{-1}$**	**Удельное сопротивление Ом · см**
0,7455	1330	752
0,0746	133,0	7519
0,0149	26,6	37594

Если измерения не могут быть проведены при температуре 20°С, значения электропроводности растворов калия хлорида, указанные в Табл. 2.2.38.1, корректируют по уравнению, действующем в температурном интервале (20±5)°С:

$$C_T = C_{20}\,[1 + 0,021\,(T-20)],$$

где:

T – температура, при которой проводят измерения, указанная в частной статье;

C_T – электропроводность раствора при T°С;

C_{20} – электропроводность раствора при температуре 20°С.

ПРОВЕДЕНИЕ ИЗМЕРЕНИЙ

Определение постоянной камеры

Выбирают измерительную камеру, соответствующую электропроводности испытуемого растора. Чем выше ожидаемая электропроводность, тем большей должны быть постоянная камеры (ниже *ρ*), то есть измеряемое значение *R* должно быть настолько высоким, насколько позволяет используемый прибор. Обычно определения измерительной камеры имеют постоянную порядка 0,1 $см^{-1}$, 1 $см^{-1}$ и 10 $см^{-1}$. Определяют тот из стандартных растворов *калия хлорида Р*, который больше подходит для проведения измерений. Измерительную камеру несколько раз промывают *водой, свободной от диоксида углерода, Р*, приготовленной из *воды дистиллированной Р*, и по крайней мере дважды раствором калия хлорида, используемого для определения постоянной камеры. Измеряют удельное сопротивление заполненной раствором калия хлорида камеры при температуре (20±0,1)°С или при температуре, указанной в частной статье. Постоянную *C* ($см^{-1}$) измерительной камеры рассчитывают по формуле:

$$C = R_{KCl} \cdot k_{KCl},$$

где:

R_{KCl} – сопротивление измерений в мегоомах;

k_{KCl} – электропроводность используемого стандартного раствора *калия хлорида Р*, в мкСм · см$^{-1}$.

Измеренное значение постоянной *С* камеры не должно отличаться от указанного более, чем на 5%.

Определение удельной электропроводности испытуемого раствора

После того, как прибор откалиброван с использованием одного из стандартных растворов, измерительную камеру промывают несколько раз *водой, свободной от диоксида углерода, Р*, приготовленной из *воды дистиллированной Р*, и по крайней мере дважды водным испытуемым раствором при температуре (20±0,1)°С или при температуре, указанной в частной статье. Затем измерения проводят так, как указано в частной статье.

2.2.39. МОЛЕКУЛЯРНО-МАССОВОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ДЕКСТРАНОВ

Определение проводят методом эксклюзионной хроматографии (*2.2.30*).

Испытуемый раствор. 0,200 г испытуемой субстанции растворяют в подвижной фазе и доводят объем раствора этим же растворителем до 10 мл.

Маркерный раствор. 5 мг *глюкозы Р* и 2 мг *декстрана* V_o ФСО растворяют в 1 мл подвижной фазы.

Градуировочные растворы. Навеску каждого из указанных стандартных образцов: 15 мг *декстрана 4 для градуировки ФСО*, 15 мг *декстрана 10 для градуировки ФСО*, 20 мг *декстрана 40 дляградуировки ФСО*, 20 мг *декстрана 70 для градуировки ФСО* и 20 мг *декстрана 250 для градуировки ФСО* отдельно растворяют в 1 мл подвижной фазы.

Возможно использование стандартных образцов *декстранов для градуировки* с другими паспортными данными M_w, в этом случае для градуировки хроматографической системы рекомендуется использовать дополнительно еще не менее двух стандартных образцов *декстранов.*

Условия хроматографирования как, например, размер и количество колонок, тип сорбента, состав и скорость подвижной фазы, объем вводимой пробы и другие параметры, указываются в частных статьях и могут варьировать. При этом должны выполняться требования к градуировке и условия теста «Проверка пригодности хроматографической системы»

Раствор для проверки пригодности хроматографической системы. 20 мг *декстрана 40 для проверки пригодности хроматографической системы ФСО* (для анализа субстанции декстрана 40) или 20 мг *декстрана 60/70 для проверки пригодности хроматографической системы ФСО* (для анализа субстанций декстрана 60 и декстрана 70) растворяют в 1 мл подвижной фазы.

Хроматографирование может быть проведено на хроматографе с дифференциальным рефрактометрическом детектером при следующих условиях:

- колонка, заполненная *агарозой поперечно-сшитой для хроматографии Р* или серий колонок размером 0,3 м х 10 мм каждая, заполненные *полиэфирным гидроксилованным гелем для хроматографии Р*;
- подвижная фаза: раствор 7 г *натрия сульфата безводного Р* и 1 г *хлорбутанола Р* в 1 л *воды Р*;
- скорость подвижной фазы от 0,5 мл/мин до 1 мл/мин, поддерживаемая постоянно с точностью +1% в час;
- петлевой дозатор с объемом петли от 100 мкл до 200 мкл;
- температура системы поддерживается постоянной с точностью ±0,1°С.

ГРАДУИРОВКА ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ

Хроматографируют несколько раз выбранный объем маркерного раствора. На хроматограмме должны присутствовать два пика: первый пик соответствует *декстрану* V_o *ФСО*, второй пик соответствует *декстрозе (глюкозе) Р*. Исходя из объема элюирования декстрана V_o, рассчитывают объем эксклюзии V_o; полный объем V_t рассчитывают по пику, соответствующему глюкозе.

Хроматографируют определенный объем каждого из градуировочных растворов. Для каждой полученной хромотограммы проводят базовую линию, обращая внимание на правильнойть определения начала и конца пика. Каждую хроматограмму делят вертикальными равноудаленными линиями на *р* секций (количеством не менее 60), что соответствует равным объемам элюирования. Для каждой секции *i*, соответствующей объему элюирования V_i, измеряют высоту (y_i) от базовой линии до линии хроматограммы и рассчитывают коэффициенты распределения (K_i) по формуле:

$$K_i = \frac{(V_i - V_o)}{(V_t - V_o)}, \qquad (1)$$

где:

V_o – объем эксклюзии, определенный по пику, соответствующему *декстрану* V_o *ФСО* на хроматограмме маркерного раствора ;

V_t - полный объем колонки, определенный по пику, соответствующему глюкозе на хроматограмме маркерного раствора;

V_i - объем элюирования для секции *i*, полученный для хроматограммы каждого из градуировочных растворов.

Градуировку проводят, используя один из следующих методов.

Градуировка по градуировочному графику. По уравнению (1) для каждого из декстранов для градуировки рассчитывают коэффициент распределения K_{max}, соответствующий максимальной высоте пика хроматограммы. На полулогарифмической бумаге строят зависимость значений K_{max} (ось абсцисс) от молекулярной массы для максимальной высоты пика (M_{max}) каждого из декстранов для градуировки и глюкозы (ось ординат). Через все полученные точки проводят первую градуировочную линию, экстраполируя ее из точки K_{max}, полученной для *декстрана 250 для градуировки ФСО*, до более низких значений *K*, полученных для тех же стандартных растворов (см. Рис. 2.2.39.-1).

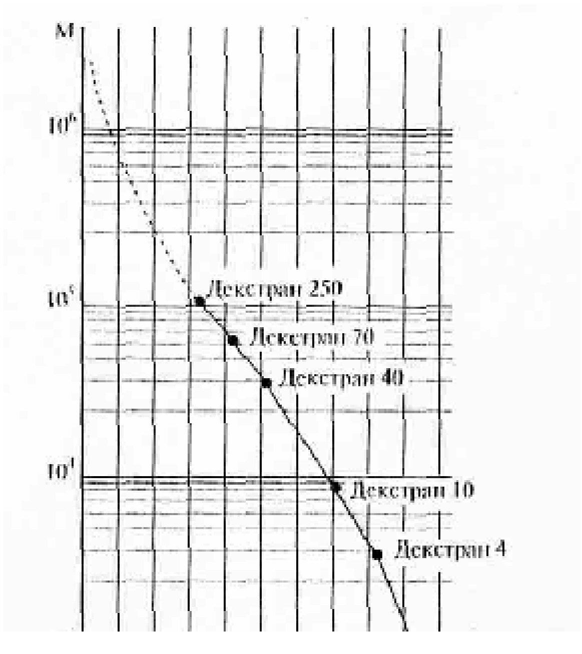


Рис. 2.2.39.1. Пример градуировочного графика

Пунктиром указана часть градуировочного графика, полученная экстраполированием. Горизонтальными линиями в нижней части рисунка указаны ширина и положения хроматографических линий, полученных для каждого декстрана для градуировки

Используя полученный первый градуировочный график, находят для всех значений K_i для всех хроматограмм соответствующие значения молекулярных масс M_i, получая в таком способе графическую зависимость для рассчета молекулярно-массового распределения. Для всех декстранов для градуировки расчитывают среде массовую молекулярную массу M_w по уравнению (3), приведенному ниже. Градуировочный график может быть использован для расчетов, если расчеты значения M_w для каждого из декстранов для градуировки не отличаются от указанных в паспорте значений больше чем на 5% и средние отклонения для всех декстранов не превышает ±3%. Если данные условия не выполняются, градуировочный график смещают вдоль оси ординат и повторяют вышеописанные операции пока рассчитанные и указанные в паспорте значения M_w будут отличаться не более чем на 5%.

Градуировка при помощи расчетного метода. При помощи уравнений (2) и (3), приведенных ниже, и подходящего метода (возможно использование итеративного метода Гаусса-Ньютона, модифицированного метода Хартли. Также возможно построение кривой при помощи компьютерных программ, которые используют принцип нелинейного регрессивного анализа) рассчитывают значения коэффициентов b_1, b_2, b_3, b_4 и b_5, для которых полученные значения M_w могут отличаться не более чем на 5% от соответственных паспортных значений M_w для каждого декстрана для калибровки и должны быть 180±2 для глюкозы.

При расчетах M_w глюкозы в уравнении (2) допускают K_i=1.

$$M_i = b_5 + e^{(b_4 + b_1 \cdot K_1 + b_2 \cdot K_i^2 + b_3 \cdot K_i^3)} \qquad (2)$$

$$\overline{M}_w = \frac{\sum_{i+1}^{p}(y_i M_i)}{\sum_{i=1}^{p} y_i}, \qquad (3)$$

$$\overline{M}_w = \frac{\sum_{i+1}^{n}(y_i M_i)}{\sum_{i=1}^{n} y_i}, \qquad (4)$$

где:

p - число секций, на которые поделена хроматограмма;

y_i – высота хроматографической линии над базовой линией в i-той секции;

M_i – молекулярная масса для секции *i*.

ПРИГОДНОСТЬ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ

Хроматографируют выбранный объем соответствующего раствора для проверки пригодности хроматографической системы.

Средняя молекулярная масса декстрана для проверки пригодности ФСО. Рассчитывают значение M_w, как указано в разделе «Градуировка хроматографической системы» используя или градуировочный график, или значения коэффициентов b_1, b_2, b_3, b_4 и b_5. Результаты анализа считаются достоверными, если полученное значение M_w находится в пределах:

- от 41000 до 47000 (для *декстрана 40 для проверки пригодности ФСО*);
- от 67000 до 75000 (для *декстрана 60/70 для проверки пригодности ФСО*).

Средняя молекулярная масса 10% высокомолекулярной фракции декстрана. Значение M_w для 10% высокомолекулярной фракции декстрана, которая элюируется в секциях от 1 до *n* включительно, рассчитывают по формуле:

$$\overline{M}_w = \frac{\sum_{i=1}^{n}(y_i M_i)}{\sum_{i=1}^{n} y_i}, \qquad (4)$$

где:

n – номер секции, для которой выполняются неравенства:

$$\sum_{i=1}^{n} y_i \le 0{,}1\left(\sum_{i=1}^{p} y_i\right) \qquad (5)$$

$$\sum_{i=1}^{n+1} y_i \ \rangle\ 0{,}1\left(\sum_{i=1}^{p} y_i\right), \qquad (6)$$

где:

p – количество секций, на которые разделена хроматограмма;

y_i – высота хроматографической линии над базовой линией для секции *i*;

M_i – молекулярная масса для секции *i.*

Результаты анализа считаются достоверными, если полученное значение M_w для 10% высокомолекулярной фракции декстрана находится в пределах:

- от 110000 до 130000 (для *декстрана 40 для проверки пригодности ФСО*);
- от 190000 до 230000 (для *декстрана 60/70 для проверки пригодности ФСО*).

Средняя молекулярная масса 10% низкомолекулярной фракции декстрана. Значение M_w для 10% низкокомолекулярной фракции декстрана, которая элюируется в секциях хроматограмм от секции *p* до секции *m* включительно, рассчитывают по формуле:

$$\overline{M}_w = \frac{\sum_{i=m}^{p}(y_i M_i)}{\sum_{i=m}^{p} y_i}, \qquad (7)$$

где:

m – номер секции, для которой выполняются неравенства:

$$\sum_{i=m}^{p} y_i \le 0{,}1\left(\sum_{i=1}^{p} y_i\right) \qquad (8)$$

$$\sum_{i=m-1}^{p} y_i \ \rangle\ 0{,}1\left(\sum_{i=1}^{p} y_i\right), \qquad (9)$$

где:

p – количество секций, на которые разделена хроматограмма;

y_i – высота хроматографической линии над базовой линией для секции *i*;

M_i – молекулярная масса для секции *i.*

Результаты анализа считаются достоверными, если полученное значение M_w для 10% низкомолекулярной фракции декстрана находится в пределах:

- от 6000 до 8500 (для *декстрана 40 для проверки пригодности ФСО*);
- от 7000 до 11000 (для *декстрана 60/70 для проверки пригодности ФСО*).

Параллельно с раствором проверки пригодности хроматографической системы хроматографируют также маркерный раствор.

Для получения более надежных результатов в частных статьях рекомендуется регламентировать такие отношения сигнал/шум, степень разделения пиков декстрана 40 и глюкозы, эффективность пика глюкозы и близость расчета M_w для повторных хроматограмм для проверки пригодности хроматографической системы.

МОЛЕКУЛЯРНО-МАССОВОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ АНАЛИЗИРУЕМОГО ДЕКСТРАНА

Хроматографируют выбранный объем испытуемого раствора и значение M_w для молекулярно-массового распределения декстрана, значение M_w для 10% высокомолекулярной фракции декстрана и значение M_w для 10% низкомолекулярной фракции декстрана, рассчитывают, как описано в разделе «Пригодность хроматографической системы».

Параллельно с испытуемым раствором хроматографируют маркерный раствор.

Полученные результаты молекулярно-массового распределения округляют до 10 значащих единиц.

В настоящей документации к декстранам для градуировки ФСО и к декстрану для проверки пригодности ФСО приводятся паспортные значения средне массовой молекулярной массы M_w, значения молекулярной массы в максимуме пика, а также пределы для средней молекулярной массы, средней молекулярной массы для 10% высокомолекулярной фракции декстрана и средней молекулярной массы для 10% низкомолекулярной фракции декстрана.

2.2.40. СПЕКТРОФОТОМЕТРИЯ БЛИЖНЕГО ИК-ДИАПАЗОНА

Спектрофотометрия ближнего ИК-диапазона – метод, который особенно полезен для идентификации органических веществ. Несмотря на то, что такие спектры ограничены поглощением связей C-H, N-H, O-H и S-H, они, обычно, имеют высокую информативность. Спектры зависят от различных параметров, таких как размер частиц, полиморфизм, остаточные растворители, влажность, которые не всегда могут быть учтены. По этой причине прямое сравнение спектра вещества и спектра образца сравнения обычно невозможно и требуется проведение соответствующей валидированной математической обработки полученных данных.

АППАРАТУРА

Спектрофотометры, предназначенные для получения спектров в ближнем ИК-диапазоне, состоят из:

- фильтра, дифракционной решётки или интерферометра, способных обеспечить целый диапазон электромагнитного излучения в области приблизительно от 780 нм до 2500 нм (12821 $см^{-1}$ до 4000 $см^{-1}$),

- устройств сбора и измерения интенсивности прошедшего или отражённого излучения (пропускание или отражение), таких как интегрирующая сфера, оптоволоконный датчик и т.д., соединённых с соответствующим детектором,

- устройств математической обработки полученных спектральных данных.

ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦА

Для измерения пропускания. Данный способ обычно используется в случае разбавленных или неразбавленных жидкостей, а также твёрдых веществ, находящихся в растворе.

Пробы исследуют в кювете с подходящей длиной оптического пути (обычно от 0,5 мм до 4 мм), прозрачной для излучения ближнего ИК-диапазона либо погружают в них оптоволоконный датчик подходящей конфигурации, которая создаёт спектр в области пропускания совместимой со спецификациями прибора и соответствующей предполагаемой цели.

При получении спектров жидкой пробы в ближнем ИК-диапазоне должны приниматься во внимание возможность зависящих от температуры отклонений спектров или любых других эффектов, оказывающих влияние на спектры.

Во всех случаях способом, соответствующим оптической конфигурации прибора, должны быть внесены поправки, учитывающие влияние фона, например, из спектра исследуемой пробы может быть вычтен спектр сравнения воздуха (для жидкостей) или растворителя (для растворов).

Для измерения диффузного отражения. Данный способ обычно используется для твёрдых тел.

Пробы исследуют с помощью подходящего устройства. При помещении в пробу оптоволоконного датчика следует обращать внимание на положение датчика, необходимо, чтобы в течение получения спектра он оставался неподвижным и чтобы условия измерения были как можно более воспроизводимыми от одной пробы к другой.

Во всех случаях способом, соответствующим оптической конфигурации прибора, должны быть внесены поправки, учитывающие влияние фона, например, из спектра исследуемой пробы должен быть вычтен спектр внутреннего или внешнего стандарта отражения.

Следует также учитывать размер частиц и степень гидратации или сольватации.

Для измерения двойного пропускания Данный способ обычно используется в случае разбавленных или неразбавленных жидкостей, а также твёрдых веществ, находящихся в растворе или суспензии.

Исследуемую пробу помещают в кювету с подходящим диффузным отражателем, сделанным из металла либо из инертного вещества (например, оксид титана), не дающего спектра в ближнем ИК-диапазоне, и введённого в подходящей концентрации в пробу. Пробы исследуют так, как описано для измерения пропускания или диффузного отражения.

КОНТРОЛЬ ЗА РАБОТОЙ ПРИБОРА

При использовании прибора следуют инструкциям производителя; регулярно, в зависимости от применения прибора и исследуемых веществ, проводят предписанные испытания.

Проверка шкалы длин волн (кроме прибора, оснащённого светофильтром). Используемую шкалу длины волны, обычно в области между 780 нм и 2500 нм, проверяют с помощью подходящего стандарта (стандартов) длин волн, который имеет характеристические максимумы при исследуемых длинах волн; такими стандартами могут быть, например, полистирол или оксиды редкоземельных элементов.

Проверка повторяемости (сходимости) длин волн (кроме прибора, оснащённого светофильтром). Повторяемость длин волн проверяют с помощью подходящего стандарта (стандартов), например, полистирола или оксидов редкоземельных элементов. Стандартное отклонение длин волн зависит от спецификации спектрофотометра.

Проверка повторяемости отклика. Повторяемость отклика проверяют с помощью подходящего стандарта (стандартов), например, отражающих термопластических смол, покрытых сажей. Стандартное отклонение отклика зависит от спецификации прибора.

Проверка фотометрического шума. Для определения фотометрического шума используют подходящий стандарт отражения, например, отражающие керамические плитки или отражающие термопластические смолы. Сканируют стандарт отражения в соответствии с рекомендациями производителя спектрофотометра и рассчитывают фотометрический шум пика к пику либо при данной длине волны. В последнем случае фотометрический шум характеризуется стандартным отклонением откликов. Фотометрический шум зависит от спецификации прибора.

СОЗДАНИЕ СПЕКТРАЛЬНОЙ БИБЛИОТЕКИ СРАВНЕНИЯ

Снимают спектры подходящего числа серий веществ, полностью исследованных, как описано в монографии материалов, и которые имеют отличия (например, в производителе, размерах частиц) типичные для анализируемого материала.

Набор спектров даёт информацию, которая определяет границы подобия для данного вещества в спектральной базе данных, которая используется для идентификации вещества. Число веществ в базе данных зависит от особенностей её применения

Коллекция спектров в базе данных может быть представлена различными способами, определяемыми математической методикой, используемой для идентификации. Это могут быть:

- индивидуальные спектры, представляющие вещество,

- усреднённые спектры для каждого вещества и описание их изменчивости.

Селективность базы данных, которая позволяет положительно идентифицировать данный материал либо достоверно отличить его от других материалов, содержащихся в базе данных, должна быть установлена во время процедуры. Для уверенности в пригодности базы данных эта селективность должна регулярно проверяться; в особенности это необходимо делать после любых значительных изменений, произошедших с веществом, например, изменение поставщика или производственного процесса.

База данных пригодна только для исходного прибора, либо для подобного прибора при условии определения того, что перенесенная на прибор база данных остаётся пригодной.

Методика. Подготовку и исследование пробы проводят таким же образом, как и при создании базы данных. Для облегчения сравнения спектров могут быть использованы подходящие математические преобразования lg (1/*T*) или lg (1/*R*) спектра для образца и спектральной библиотеки сравнения, например, получение второй производной.

Сравнение преобразований спектров исследуемого образца и спектральной библиотеки сравнения включает использование подходящей методики хемометрической классификации.

2.2.41. КРУГОВОЙ ДИХРОИЗМ

Круговым дихроизмом называют разность оптических плотностей в пределах полосы поглощения для света с левой и правой круговой поляризацией, присущую оптически активным веществам.

Прямое измерение даёт величину:

$$\Delta A = A_L - A_R$$

ΔA – оптическая плотность кругового дихроизма,

A_L – оптическая плотность для света с левой круговой поляризацией,

A_R – оптическая плотность для света с правой круговой поляризацией.

Круговой дихроизм рассчитывают по уравнению:

$$\Delta e = e_L - e_R = \frac{\Delta A}{c \times l}$$

$\Delta\varepsilon$ – молярный круговой дихроизм или молярный дифференциальный дихроичный коэффициент поглощения, выраженный в л·моль$^{-1}$·см$^{-1}$,

ε_L – молярный коэффициент поглощения (2.2.25) для света с левой круговой поляризацией,

ε_R – молярный коэффициент поглощения для света с правой круговой поляризацией,

c – концентрация вещества в исследуемом растворе в моль·л$^{-1}$,

l – длина оптического пути в сантиметрах.

Для характеристики кругового дихроизма могут быть также использованы следующие единицы:

Фактор диссимметрии:

$$g = \frac{\Delta e}{e}$$

ε – молярный коэффициент поглощения (2.2.25).

Молярная эллиптичность:

Некоторые типы приборов непосредственно показывают величину эллиптичности Θ, выраженную в градусах. При использовании таких приборов молярная эллиптичность [Θ] может быть рассчитана по следующему уравнению:

$$[\Theta] = \frac{\Theta \times M}{c \times l \times 10}$$

[Θ] – молярная эллиптичность, выраженная в градус·см^2·децимоль$^{-1}$,

Θ – величина эллиптичности, показываемая прибором,

M – относительная молекулярная масса исследуемого вещества,

c – концентрация исследуемого вещества в растворе в г/мл,

l – длина оптического пути в сантиметрах.

Молярная эллиптичность также связана с молярным круговым дихроизмом следующим уравнением:

$$[\Theta] = 2{,}303\Delta e\,\frac{4500}{p} \approx 3300\Delta e$$

Молярная эллиптичность часто используется при анализе белков и нуклеиновых кислот. В этом случае молярная концентрация, выраженная в единицах мономерных остатков, рассчитывается, исходя из выражения:

$$\frac{\text{молекулярная масса}}{\text{число аминокислот}}$$

Для белков среднее значение относительной молекулярной массы мономерного остатка составляет от 100 до 120 (в среднем 115), для нуклеиновых кислот (в виде натриевой соли) – около 330.

Прибор. Источником света (S) является ксеноновая лампа (Рис. 2.2.41.-1); свет проходит через двойной монохроматор (M), снабжённый кварцевыми призмами (P1, P2).

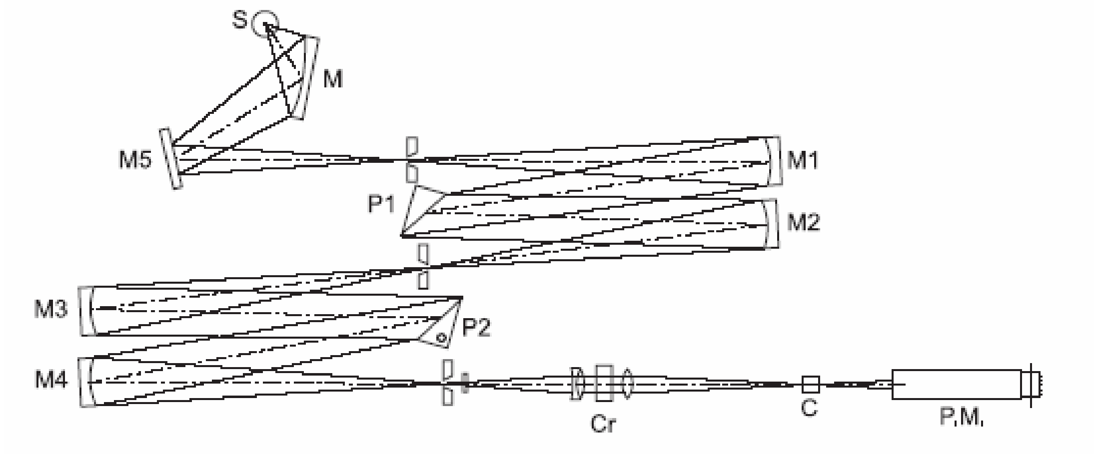


Рис. 2.2.41.-1. - *Оптическая схема дихрографа*

Линейный луч из первого монохроматора расщепляется на два компонента, поляризуемые под правым углом вторым монохроматором. Дополнительный луч устраняется выходной щелью монохроматора.

Поляризованный и монохроматический свет проходит через двоякопреломляющий модулятор (Cr): в результате образуется переменный свет с круговой поляризацией.

Затем луч проходит через исследуемый образец (C) и попадает на фотоумножитель (PM), за которым следует усилитель, производящий два электрических сигнала: один постоянного тока V_c, а другой переменного тока с частотой модуляции V_{ac} характерной для исследуемого образца. Фаза является показателем кругового дихроизма. Отношение V_{ac}/V_c пропорционально дифференциальной оптической плотности Δ*A*, которая создаётся сигналом. Дихрограф обычно позволяет проводить измерения в диапазоне длин волн от 170 до 800 нм.

Градуировка прибора. *Точность шкалы оптической плотности*. Растворяют 10,0 мг *изоандростерона R* в *диоксане R* и доводят до 10,0 мл этим же растворителем. Снимают спектр кругового дихроизма раствора в диапазоне от 280 нм до 360 нм. Величина Δ*ε*, измеренная в максимуме при 304 нм, равна + 3,3.

Также может быть использован раствор *(1S)-(+)-10-камфорсульфоновой кислоты R.*

Линейность модуляции. Растворяют 10,0 мг *1S)-(+)-10-камфорсульфоновой кислоты R* в *воде* R и доводят этим же растворителем до 10,0 мл. Определяют точную концентрацию камфорсульфоновой кислоты в растворе методом УФ-спектрофотометрии (2.2.25), используя величину удельного показателя поглощения при 285 нм, равную 1,49.

Снимают спектр кругового дихроизма раствора в диапазоне от 185 нм до 340 нм. Величина Δ*ε*, измеренная в максимуме при 290,5 нм, равна от + 2,2 до + 2,5, а измеренная в максимуме при 192,5 нм – от – 4,3 до – 5.

Может быть использован *(1S)-(+)-* или его оптический изомер *-(1R)-(+)-камфорсульфонат аммония R.*

2.2.42. Плотность твердых тел

Плотность твердых тел соответствует их средней массе единицы объема и обычно выражается в граммах на сантиметр кубический (г/см^3), хотя международной единицей является килограмм на метр кубический (1 г/см^3=1000 кг/м^3).

В отличие от газов и жидкостей, плотность которых определятся только температурой и давлением, плотность твердых тел зависит также от строения молекул и поэтому изменяется в зависимости от структуры кристалла и степени кристалличности.

В том случае, когда твердые частицы являются аморфными или частично аморфными, их плотность зависит от способа получения и обработки.

Поэтому, в отличие от жидкостей, плотности двух химически эквивалентных твердых веществ могут быть различными, и это отличие отражает соответствующие различия в строении твердых тел.

Плотность частиц – важная физическая характеристика фармацевтических субстанций.

Плотность твердой частицы может принимать различные значения в зависимости от метода, используемого для измерения ее объема. Следует различать три уровня выражения плотности:

- кристаллическая плотность, которая используется только для твердой фракции материала; кристаллическую плотность также называют истинной плотностью;
- плотность частиц, которая характеризует также объем пор внутри твердых частиц;
- объемная плотность, которая включает объемы пустот между частицами, образованные в слое порошка; объемную плотность называют также кажущейся плотностью (насыпной массой).

Кристаллическая плотность - это средняя масса единицы объема вещества, не считая всех пустот, которые не являются неотъемлемой характеристикой кристаллической решетки вещества. Это свойство, присущее веществу и, поэтому ее величина не должна зависеть от способа определения. Кристаллическая плотность может быть определена как расчетным путем, так и путем простого измерения.

А. Расчетную кристаллическую плотность получают исходя из кристаллографических данных (размер и состав элементарной ячейки) идеального кристалла, например, при анализе дифракции рентгеновских лучей, и молекулярной массы вещества.

В. Измеренная кристаллическая плотность - это отношение массы к объему, определенных для монокристалла вещества.

Плотность частицы вещества

Плотность частицы вещества учитывает как кристаллическую плотность, так и пористость частицы вещества (закрытые и открытые поры). Таким образом, плотность частицы зависит от величины установленного объема, что в свою очередь зависит от метода измерения. Плотность частицы вещества может быть установлена следующими двумя методами.

А. Пикнометрическая плотность определяется путем измерения объема, занимаемого известной массой порошкообразного вещества, который эквивалентен объему газа, вытесненного веществом (для его определения используется пикнометр газового вытеснения 2.9.23). Объем вещества, установленный таким способом, включает объем, занимаемый открытыми порами, однако он не включает объем закрытых не доступных для газа пор. Благодаря высокой диффузионной активности гелия, который является наиболее предпочтительным для определения газом, большинство открытых

пор доступны для газа. Поэтому пикнометрическая плотность тонко измельченного порошка, в общем, не сильно отличается от значений кристаллической плотности.

B. Плотность, установленная при помощи ртутного измерителя пористости, также называемая гранулярной плотностью. В этом методе также не учитывается объем, занимаемый закрытыми порами, однако объем открытых пор учитывается только для пор, размер которых превышает некоторый предел. Значение этой предельной величины пор зависит от давления, под которым подается ртуть во время измерения, и при обычных условиях измерения ртуть не проникает в мельчайшие поры, доступные для гелия. Для одного образца могут быть получены различные значения гранулярной плотности, так как возможно определение плотности для каждого используемого рабочего давления, что соответствует различным значениям предельных величин пор при различных давлениях.

Плотность (насыпная масса) при свободной засыпке и уплотнении

Плотность при свободной засыпке порошка учитывает вклад свободного объема между частицами порошка. Следовательно, плотность при свободной засыпке зависит как от плотности частиц порошка, так и от их пространственного расположения в слое порошка.

Плотность при свободной засыпке зачастую очень сложно измерить, так как самые незначительные нарушения в слое могут приводить к новому значению плотности. Таким образом, важным требованием при сообщении значений насыпной плотности является указание метода ее определения.

A. Значение плотности при свободной засыпке определяется измерением объема известной массы порошка, прошедшего через сито, мерным цилиндром (2.9.15).

B. Плотность при уплотнении достигается путем механического постукивания мерным цилиндром, содержащим образец порошка. После измерения начального объема цилиндр подвергается механическому постукиванию, и наблюдение за объемом продолжают до тех пор, пока дальнейшее изменение объема становится незначительным (2.9.15).

2.2.43. МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ

Масс-спектрометрия основана на прямом измерении отношения массы к числу элементарных положительных или отрицательных зарядов ионов (*m/z*), полученных из анализируемого вещества и находящихся в газовой фазе. Данное отношение выражается в атомных единицах массы (1 а.е.м. = одной двенадцатой массы нуклида ^{12}C) или в дальтонах (1 Да = массе атома водорода).

Ионы, образовавшиеся в ионном источнике, ускоряются и перед попаданием в детектор разделяются с помощью масс-анализатора. Все эти действия происходят в камере, в которой насосная система поддерживает вакуум от 10^{-3} до 10^{-6} Па.

Результирующий масс-спектр является графиком зависимости относительного количества различных ионов от отношения *m*/*z*. Сигнал, отвечающий иону, представлен несколькими пиками, соответствующими статистическому распределению различных изотопов этого иона. Такой сигнал называется *изотопным профилем,* а пик (по крайней мере, для небольших молекул), представляющий наиболее распространённые изотопы для каждого атома, - *моноизотопным пиком*.

Масс-спектрометрический анализ даёт важную качественную (определение молекулярных масс; информация, касающаяся структуры определяемых фрагментов) и количественную (с использованием внешнего или внутреннего стандартов) информацию с пределом обнаружения от пикомоля до фемтомоля.

ВВОД ОБРАЗЦА

Первой стадией анализа является ввод образца в прибор без значительного нарушения вакуума. В широко распространённом методе, называемом *прямым вводом жидкости*, образец помещается на конец цилиндрического штока (в кварцевом тигле, на проволоке или на металлической поверхности). Этот шток через вакуумный шлюз, в котором поддерживается первичный промежуточный вакуум между атмосферным давлением и вторичным вакуумом прибора, вводится в спектрометр.

Другие системы ввода позволяют проанализировать компоненты смеси, так как они разделяются с помощью соответствующего прибора, соединённого с масс-спектрометром.

Газовая хроматография/масс-спектрометрия. При использовании подходящих колонок (капиллярных или полукапиллярных) возможно непосредственное введение конца колонки в ионный источник прибора без применения сепаратора.

Жидкостная хроматография/масс-спектрометрия. Такая комбинация особенно полезна для анализа полярных соединений, которые являются недостаточно летучими либо слишком термолабильными, для того чтобы их можно было проанализировать методом газовой хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией. Данный метод осложняется трудностью получения ионов в газовой фазе из жидкой фазы, что требует применения специальных интерфейсов, таких как:

- *прямой жидкостный ввод*: подвижная фаза распыляется и растворитель испаряется перед ионным источником прибора,

- *интерфейс с пучком частиц*: подвижная фаза, скорость которой может достигать 0,6 мл/мин, распыляется в десольватационной камере, в результате в ионный источник прибора попадают лишь анализируемые вещества в нейтральной форме; данный способ может быть использован для соединений с относительно низкой полярностью и молекулярными массами меньше 1000 Да,

- *интерфейс с движущейся полосой*: подвижная фаза, скорость которой может достигать 1 мл/мин, наносится на поверхность движущейся полосы; после выпаривания растворителя анализируемые вещества переносятся к ионному источнику прибора, где подвергаются ионизации; данный способ плохо подходит для очень полярных или термолабильных соединений.

Другие виды интерфейсов (электрораспыление, термораспыление, химическая ионизация при атмосферном давлении) могут рассматриваться как самостоятельные методы ионизации и описаны в разделе, посвящённом способам ионизации.

Сверхкритическая флюидная хроматография/масс-спектрометрия. Подвижная фаза, обычно состоящая из находящегося в сверхкритическом состоянии диоксида углерода, переходит в газообразное состояние после прохождения через нагретую заслонку, находящуюся между колонкой и ионным источником.

Капиллярный электрофорез/масс-спектрометрия. Элюент вводится в ионный источник, в некоторых случаях после добавления дополнительного растворителя, для того чтобы достичь скорости потока порядка нескольких миллилитров в минуту. Ограничениями данного метода являются малые

количества вводимого образца и необходимость использовать летучие буферные растворы.

СПОСОБЫ ИОНИЗАЦИИ

Электронный удар. Образец, находящийся в газообразном состоянии, ионизируется потоком электронов, энергия которых (обычно 70 эВ) больше энергии ионизации образца. При этом кроме молекулярного иона M^+ образуются осколочные ионы характерные для данной молекулярной структуры. Главным ограничением данного способа является необходимость испарения образца, что делает невозможным его применение для полярных, термолабильных или высокомолекулярных соединений. Ионизация электронным ударом может быть использована в газовой хроматографии, соединённой с масс-спектрометрией, а в некоторых случаях и в жидкостной хроматографии.

Химическая ионизация. Этот тип ионизации предполагает использование реагентного газа, такого как метан, аммиак, монооксид азота, диоксид азота или кислород. Спектр характеризуется ионами $(M + H)^+$ или $(M - H)^-$ типов или ионами-аддуктами, образованными из аналита и используемого газа. Осколочные ионы образуются реже, чем при ионизации электронным ударом. Для термолабильных веществ используется разновидность данного метода ионизации, при которой образец, находящийся на проволоке, очень быстро испаряется вследствие эффекта Джоуля-Томсона (десорбционная химическая ионизация).

Бомбардировка быстрыми атомами (FAB) или ионизация бомбардировкой быстрыми ионами (жидкостная масс-спектрометрия вторичных ионов – LSIMS). Образец, растворённый в вязкой матрице, например в глицерине, наносится на металлическую поверхность и ионизируется потоком нейтральных атомов, например, аргона или ксенона или обладающими большой кинетической энергией ионами цезия. Образуются ионы $(M + H)^+$ или $(M - H)^-$ типов либо ионы-аддукты, сформированные матрицей или образцом. Данный тип ионизации хорошо подходит для полярных, термолабильных соединений, имеющих молекулярную массу до 10000 Да. При добавлении к подвижной фазе 1 – 2% глицерина он может быть использован для жидкостной хроматографии, однако скорость подвижной фазы должна быть очень низкой (несколько микролитров в минуту). При нанесении тонкого слоя матрицы на поверхность хроматографических пластинок такой способ ионизации может быть использован и в тонкослойной хроматографии.

Полевая десорбция или полевая ионизация. Образец испаряется около вольфрамовой проволоки, покрытой микроиглами (*полевая ионизация*) или помещается на эту проволоку (*полевая десорбция*). Сильное электрическое поле (напряжение около 10 кВ), возникающее между проволокой и противоэлектродом, ионизирует образец. При данных способах ионизации образуются преимущественно молекулярные ионы M^+ и $(M + H)^+$ ионы. Эти способы используются для малополярных и/или термолабильных соединений.

Лазерная десорбция – ионизация с помощью матрицы (MALDI). Образец смешанный с подходящей матрицей и помещённый на металлическую подложку, ионизируется импульсным лазерным излучением с длиной волны от УФ- до ИК-диапазона (продолжительность импульсов может составлять от пикосекунды до нескольких наносекунд). Данный способ ионизации играет важную роль при анализе соединений с очень большой молекулярной массой (более чем 100 000 Да), но ограничен использованием времяпролётного анализатора (см. ниже).

Электрораспылительная ионизация. Данный способ ионизации проводится при атмосферном давлении. Образец, находящийся в растворе, вводится в источник через капилляр, конец которого имеет потенциал порядка 5 кВ. Для облегчения распыления может использоваться газ. Испарение молекул растворителя из образующихся микрокапель приводит к образованию в газовой фазе однозарядных или многозарядных ионов. Скорости подвижной фазы при данном виде ионизации могут изменяться от нескольких микролитров в минуту до 1 мл/мин. Такая ионизация подходит для полярных соединений, а также для исследования биомолекул с молекулярными массами до 100 000 Да. Она может сочетаться с жидкостной хроматографией или капиллярным электрофорезом.

Химическая ионизация при атмосферном давлении (APCI). Ионизация проводится при атмосферном давлении под действием электрода, имеющего потенциал несколько киловольт и помещённого на пути подвижной фазы, которая распыляется как вследствие тепловых эффектов, так и благодаря использованию потока азота. Образующиеся ионы являются однозарядными и относятся к $(M + H)^+$ типу в случае положительного заряда и к $(M - H)^-$ типу в случае отрицательного. Возможность использования высоких скоростей подвижной фазы (до 2 мл/мин) делает этот способ ионизации идеальным для сочетания с жидкостной хроматографией.

Термораспылительная ионизация. Образец, находящийся в подвижной фазе, состоящей из воды, органических модификаторов и содержащей летучий электролит (обычно ацетат аммония) вводится в распыленной форме после прохождения через металлический капилляр, температура которого контролируется. Допускаются скорости подвижной фазы порядка 1 мл/мин – 2 мл/мин. Ионы электролита ионизируют анализируемое соединение. Такой процесс ионизации может быть заменён или усилен электрическим разрядом величиной около 800 вольт, особенно при использовании только органического растворителя. Данный способ ионизации может быть использован в методе жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии.

АНАЛИЗАТОРЫ

Различия в работе анализаторов зависят, главным образом, от двух параметров:

- диапазон, в котором могут быть измерены отношения *m*/*z* (*массовый диапазон)*,

- *разрешение,* характеризуемое возможностью разделить два иона одинаковой интенсивности с отношениями *m*/*z,* отличающимися на ΔM и перекрывающиеся при определённом процентном превышении базовой линии; например, разрешение ($M/\Delta M$) равное 1000 с 10% превышением базовой линии позволяет провести разделение отношений *m*/*z* 1000 и 1001 с интенсивностями, на 10% превышающими базовую линию. В некоторых случаях (времяпролётные анализаторы, квадрупольные анализаторы, ионные ловушки) разрешение может быть определено как отношение между молекулярной массой и шириной пика на половине высоты (50% превышение базовой линии).

Магнитные и электростатические анализаторы. Ионы, образовавшиеся в ионном источнике, ускоряются потенциалом V и сосредотачиваются, в зависимости от устройства прибора, между магнитным (магнитное поле B) или электростатическим анализаторами (электростатическое поле E). В соответствии с законом Лапласа они перемещаются по траектории с радиусом r:

$$m/z = \frac{B^2 r^2}{2V}$$

Для накопления и измерения различных ионов, образовавшихся в источнике, могут быть использованы два типа сканирования: изменение B при постоянной величине V или изменение V при постоянной величине B. За магнитным анализатором обычно следует электрический сектор, который действует как фильтр кинетической энергии и позволяет заметно увеличить разрешение прибора. Максимальное разрешение такого прибора (двойной сектор) изменяется от 10000 до 150000 и в большинстве случаев позволяет достаточно точно оценить величину отношений *m/z* для определения элементного состава соответствующих ионов. Для однозарядных ионов массовый диапазон равен от 2000 до 15000 Да. Некоторые ионы могут разрушаться спонтанно (метастабильные переходы) или при столкновении с газом (диссоциация, активированная столкновением (CAD)) в областях между ионным источником и детектором, где отсутствует поле. Исследование этих процессов разрушения очень полезно для определения структуры и характеристики определённого соединения, входящего в состав смеси, и делает возможным использование тандемной масс-спектрометрии. В зависимости от места, в котором протекают процессы разрешения, известно много методик, которые могут быть использованы для этого:

- *режим дочернего иона* (определение состава ионов, образовавшихся при разрушении определённого родительского иона): B/E = константа, *MIKES (Mass-analysed Ion Kinetic Energy Spectroscopy)*,

- *режим родительского иона* (определение всех ионов, образовавшихся при разрушении иона с определённым отношением m/z): B^2/E = константа,

- *режим нейтральных частиц* (определение всех ионов, которые теряют идентичные фрагменты):

$B/E(1 - E/E_0)^{1/2}$ = константа, где E_0 базовый потенциал электрического сектора.

Квадрупольные анализаторы. Анализатор состоит из четырёх параллельных металлических стержней, имеющих цилиндрическое или гиперболическое поперечное сечение. Они расположены симметрично по отношению к траектории движения ионов; пары противоположных стержней присоединены к электрическому источнику. Потенциалы двух пар стержней противоположны. Они состоят из постоянного и изменяющегося компонентов. Ионы, образовавшиеся в ионном источнике, пропускаются и разделяются вследствие изменения потенциалов, приложенных к стержням, причём отношение постоянного потенциала к переменному должно оставаться неизменным. Квадрупольные анализаторы обычно имеют массовый диапазон от 1 атомной единицы массы до 2000 атомных единиц массы., хотя в некоторых случаях он может достигать 4000 атомных единиц массы. Несмотря на то, что такие анализаторы имеют меньшее разрешение, чем магнитные, они позволяют получать моноизотопный профиль однозарядных ионов, полученных во всём массовом диапазоне. Для получения спектров можно использовать три квадруполя, соединённых друг с другом, Q_1, Q_2, Q_3 (Q_2 служит ионизационной камерой, и в действительности не является анализатором; чаще всего в качестве ионизирующего газа применяют аргон).

Наиболее часто используемыми режимами сканирования являются:

- *режим дочернего иона*: Q_1 выбирает m/z ион, фрагменты которого, полученные при ионизации в квадруполе Q_2, анализируются квадруполем Q_3,

- *режим родительского иона*: Q_3 пропускает ионы только с определённым соотношением *m*/*z*, в то время как Q_1 сканирует определённый массовый диапазон. Детектируются только ионы, при разрушении которых образуется ион, отбираемый квадруполем Q_3.

- *режим нейтральных частиц*: Q_1 и Q_3 сканируют определённый массовый диапазон, но в интервале, соответствующем фрагментам, которые теряет определённое вещество или группа веществ.

Для получения спектров возможно сочетание квадрупольных анализаторов с магнитными или электростатическими, такие приборы называют *гибридными масс-спектрометрами*.

Ионные ловушки. Данные анализаторы имеют такой же принцип работы, что и квадрупольные, но в них используются трёхмерные электрические поля. Анализаторы такого типа позволяют получать спектры ионов нескольких генераций (MS^n).

Циклотронно-резонансные масс-анализаторы. Ионы, образовавшиеся в ячейке и подвергнутые действию интенсивного магнитного поля, движутся по круговым траекториям с частотами, которые могут быть непосредственно связаны с величинами отношений *m*/*z* для этих ионов при помощи преобразования Фурье. Данное явление называется ионно-циклотронным резонансом. Анализаторы такого типа состоят из сверхпроводящих магнитов и обладают очень высокой разрешающей способностью (до 1000000 и выше), а также позволяют получать MS^n спектры. Их недостатком является необходимость использования очень глубокого вакуума (порядка 10^{-7} Па).

Времяпролётные анализаторы. Ионы, образовавшиеся в ионном источнике, ускоряются потенциалом величиной от 10 кВ до 20 кВ. Они проходят через анализатор, состоящий из бесполевой трубы длиной от 25 см до 1,5 м, обычно называемой *пролётной трубой*.

Время (*t*), за которое ион достигает детектора, пропорционально квадратному корню из отношения *m*/*z*. Теоретически массовый диапазон для такого анализатора бесконечен. Практически он определяется методом ионизации или десорбции. Времяпролётные анализаторы используются, главным образом, для высокомолекулярных соединений (вплоть до нескольких сотен тысяч дальтон). Данный способ ионизации обладает очень высокой чувствительностью (достаточно несколько пикомолей вещества). Точность измерений и разрешение таких приборов могут быть значительно улучшены при использовании электростатического зеркала (рефлектрона).

ПОЛУЧЕНИЕ СИГНАЛА

Имеются три возможных режима получения сигнала.

Режим полного спектра. Записывается полный сигнал, полученный для выбранного массового диапазона. Спектр представляет собой зависимость относительной интенсивности различных ионов от величины *m*/*z*. Получаемые результаты являются, главным образом, качественными. Для более быстрой идентификации возможно использование библиотек спектров сравнения.

Фрагментометрический режим (селективное сканирование ионов). Получаемый сигнал ограничен одним (сканирование одного иона, single-ion monitoring (SIM)) или несколькими (множественное ионное сканирование, multiple-ion monitoring (MIM)) ионами, характерными для анализируемого вещества. В этом

режиме предел обнаружения значительно ниже. При использовании внутреннего или внешнего стандартов (например, дейтерированные стандарты) могут быть проведены количественные или полуколичественные измерения. При использовании времяпролётных анализаторов такие измерения невозможны.

Двойной фрагментометрический масс-спектрометрический режим (множественный мониторинг реакций, multiple reaction monitoring (MRM)). Включает специфическую мономолекулярную или бимолекулярная реакцию разрушения выбранного иона-предшественника, характерного для анализируемого вещества. Селективность и высокая специфичность данного режима получения сигнала обеспечивают превосходную чувствительность и делают его наиболее подходящим для количественных определений с использованием подходящих внутренних стандартов (например, дейтерированных стандартов). Данный вид анализа может быть проведен только при использовании приборов, снабжённых тремя соединёнными квадруполями, ионными ловушками или циклотронно-резонансными анализаторами.

ГРАДУИРОВКА

Градуировка позволяет установить соответствие между величиной *m*/*z* и детектируемым сигналом. Как правило, она проводится с использованием вещества сравнения. Градуировка может быть внешней (данные находятся в другом файле) или внутренней (вещество (вещества) сравнения смешивается с исследуемым веществом и результаты вносятся в файл с данными анализа). Число ионов или точек, необходимое для надёжной градуировки, зависит от типа анализатора и требуемой точности измерений, например, в случае магнитного анализатора, где отношение *m*/*z* экспоненциально изменяется при изменении величины магнитного поля необходимо брать настолько много точек, насколько это возможно.

ОБНАРУЖЕНИЕ СИГНАЛА И ОБРАБОТКА ДАННЫХ

Ионы, разделённые анализатором, преобразуются в электрические сигналы такими детектирующими системами, как фотоумножитель или электронный умножитель. Затем данные сигналы усиливаются и превращаются в цифровые сигналы, которые используются при обработке данных и позволяют проводить различные операции: градуировку, получение спектров, автоматические количественные расчёты, архивирование данных, создание или использование библиотек масс-спектров. Различные физические параметры, требуемые для работы прибора, в целом контролируются компьютером

2.2.44. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ОБЩЕГО ОРГАНИЧЕСКОГО УГЛЕРОДА В ВОДЕ ДЛЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

Определение содержания общего органического углерода (ООУ) является непрямым методом определения содержания сумм органических веществ в воде для фармацевтического применения. Определение содержания ООУ может также использоваться при контроле выполнения различных операций при производстве лекарственных средств.

Поскольку для определения содержания ООУ могут применяться различные методики, в данной статье приведены не описания методик, а их квалификация и интерпретация результатов в предельных испытаниях. Испытания стандартного раствора проводят через определенные интервалы времени, в зависимости от частоты измерений; раствор готовят с использованием легкоокислющейся субстанции (например, сахароза) с такой концентрацией, чтобы отклик прибора соответствовал измеряемому пределу содержания ООУ. Пригодность системы проверяют с использованием трудноокисляющейся субстанции (например, 1,4-бензохинон).

Разные типы приборов для определения ООУ в воде для фармацевтического применения, как правило, предназначены для полного окисления органических молекул в образце воды до углерода диоксида с последующим измерением его количества, используемого затем для расчета концентрации углерода в воде.

Используемый прибор в процессе работы может определять органический и неорганический углерод (неорганический углерод присутствует в виде карбонатов). Это может обеспечиваться путем определения количества неорганического углерода и вычитанием его из количества общего углерода или удалением неорганического углерода из образца при помощи продувания перед окислением. Органические молекулы могут удаляться с испытуемого образца в процессе продувания, но часть углерода, связанного с ими, в воде для фармацевтического применения, незначительна.

Прибор. Используют отградуированный прибор, установленный в режим “он-лайн” или автономно. Пригодность системы проверяют, как описано ниже, через определенный промежуток времени. Прибор должен иметь разрешающую способность определения углерода - 0,05 мг/л или менее, соответственно паспорту тзготовителя прибора.

Вода для определения содержания ООУ. Используют воду высокоочищенную, соответствующую требованиям:

- удельная электропроводность: не более 1,0 мкСм·см$^{-1}$ при температуре 25^{o}С;
- содержание общего органического углерода: не более 0,1 мг/л.

В зависимости от типа используемого прибора, критическим параметром может быть также содержание в воде тяжелых металлов или меди, что должно быть указано в инструкции изготовителя прибора.

Подготовка посуды. Используют посуду, тщательно вымотую методом, позволяющим удалить органические вещества. Для последнего промывания используют *воду для определения содержания ООУ*.

Стандартный раствор. *Сахарозу Р*, предварительно высушенную при температуре 105^{o}С в течение 3 ч, растворяют в *воде для определения ООУ*, получая раствор, содержащий 1,19 мг/л сахарозы (0,50 сг/л углерода).

Испытуемый раствор. Испытуемую воду собирают, исключая минимальное воздушное пространство, в плотноукупоренный контейнер, используя приспособление для предотвращения загрязнения. Испытание проводят сразу с целью устранения загрязнения воды от контейнера и его закрывающегося ответстия.

Раствор для проверки пригодности системы. Готовят раствор 0,75 мг/л *1,4-бензохинона Р* в *воде для определения ООУ* (0,50 мг/л углерода).

Контрольная вода для определения содержания ООУ. Используют *воду для определения содержания ООУ*, полученную одновременно с водой для приготовления стандартного раствора для проверки пригодности системы.

Контрольный раствор. Кроме контрольной воды для определения содержания ООУ, готовят подходящий контролный раствор или другие растворы, необходимые для восстановления базовой линии или корригирования градуировки в соответствии с инструкцией изготовителя прибора; устанавливают ноль прибора с использованием контрольных растворов.

Проверка пригодности системы. Проводят испытания указанных растворов и записывают отклики прибора; эффективность откликов, в процентах, рассчитывают по формуле:

$$\frac{r_{SS} - r_W}{r_S - r_W} \cdot 100,$$

где:

r_W – отклик прибора, соответствующий *воде для определения содержания ООУ*;

r_S – отклик прибора, соответствующий *стандартному раствору*;

r_{SS} – отклик прибора, соответствующий *раствору для проверки пригодности системы.*

Система считается пригодной, если эффективность отклика прибора составляет не менее 85% и не более 115% от теоретического отклика.

Методика. Записывают отклик (r_U) для испытуемого раствора. Испытуемый раствор выдерживает испытание, если значение r_U не превышает значение $r_S - r_W$.

Данная методика может быть выполнена в режиме «он-лайн» на приборе, который соответствующим образом отградуирован и соответствует требованиям пригодности системы. Прибор должен быть установлен таким образом, чтобы обеспечить показания откликов, которые соответствуют испытуемой воде.

2.2.45. СВЕРХКРИТИЧЕСКАЯ ФЛЮИДНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Сверхкритическая флюидная хроматография (СФХ, SFC) - это метод хроматографического разделения, в котором подвижная фаза является флюидом, находящимся в сверхкритическом или субкритическом состоянии. Неподвижная фаза, содержащаяся в колонке, состоит либо из тонко измельчённых твёрдых частиц, таких как силикагель или пористый графит; химически модифицированная неподвижная фаза, такая же, как и в жидкостной хроматографии, или, в случае капиллярных колонок, плёнка жидкости, равномерно нанесённая на стенки колонки.

СФХ основана на механизмах адсорбции или распределения.

АППАРАТУРА

Прибор обычно состоит из охлаждённой насосной системы, инжектора, хроматографической колонки, находящейся в термостатируемой печи, детектора, регулятора давления и регистрирующего устройства (интегратор или самописец).

Насосная система.

Насосная система необходима для поддержания постоянной скорости подвижной фазы. Колебания давления должны быть сведены к минимуму, например, путём пропускания сжимаемой жидкости через устройство, подавляющее пульсацию. Насосно-компрессорная система и соединительные линии устойчивы к давлениям, создаваемым насосом.

Точная доставка подвижной фазы при постоянных либо изменяющихся по определённой программе условиях осуществляется системами, контролируемыми микропроцессором. В случае градиентного элюирования могут быть использованы насосные системы, доставляющие растворитель (растворители) из нескольких резервуаров, смешивание растворителей может быть проведено как со стороны насоса (насосов), имеющей низкое давление, так и со стороны, имеющей высокое давление.

Инжекторы

Ввод пробы может быть осуществлён непосредственно в колонку с помощью клапана.

Неподвижные фазы

Неподвижные фазы находятся в колонках, которые были описаны в главах, посвящённых *Жидкостной хроматографии* (2.2.29) (набивные колонки) и *Газовой хроматографии* (2.2.28) (капиллярные колонки). Максимальный внутренний диаметр (Ø) капиллярной колонки равен 100 мкм.

Подвижные фазы

Обычно подвижной фазой является диоксид углерода, который может содержать полярный модификатор, такой как метанол, 2-пропанол или ацетонитрил. Состав, давление (плотность), температура и скорость используемой подвижной фазы могут быть как постоянными в течение всего хроматографического процесса (изократическое, изотермическое элюирование, элюирование при постоянной плотности), так и изменяться по определённой программе (градиентное элюирование модификатора, давления (плотности), температуры или скорости потока).

Детекторы

Наиболее часто используемыми детекторами являются спектрофотометры, работающие в ультрафиолетовой и видимой областях (UV/Vis) и пламенно-ионизационные детекторы. Кроме того, могут применяться детекторы, работа которых основана на измерении рассеяния света, ИК-спектрофотометры, катарометры или другие специальные детекторы.

МЕТОД

Исследуемый раствор (растворы) и раствор (растворы) сравнения готовят так, как описано в методике. Растворы не должны содержать твёрдых частиц.

Критерии для оценки пригодности системы были описаны в главе *Хроматографические методы разделения* (2.2.46). В данной главе были также приведены уровни, до которых можно регулировать параметры хроматографической системы, для того, чтобы она оставалась пригодной.

2.2.46. ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ РАЗДЕЛЕНИЯ

Хроматографическими называют многостадийные методы разделения, в которых компоненты образца распределяются между двумя фазами, одна из

которых является неподвижной, а другая – подвижной. Неподвижная фаза может быть твёрдым веществом, жидкостью, нанесённой на твёрдый носитель, либо гелем. Неподвижная фаза помещается в колонку, распределяется в виде тонкого слоя, плёнки и т.д. Подвижная фаза может быть газом, жидкостью или сверхкритическим газом (флюидом). Разделение основано на адсорбции, распределении, ионном обмене и т.д., либо на различиях в физико-химических свойствах молекул, таких как размер, масса, объём и т.д.

Данная глава содержит определения и расчёты общих параметров и применимых ко всем хроматографическим методам требований для пригодности системы. Принципы разделения, аппаратура и методики приводятся в следующих общих статьях:

Бумажная хроматография (*2.2.26*)

Тонкослойная хроматография (*2.2.27*)

Газовая хроматография (*2.2.28*)

Жидкостная хроматография (*2.2.29*)

Эксклюзионная хроматография (*2.2.30*)

Сверхкритическая флюидная хроматография (*2.2.45*)

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Для расчёта пределов в монографиях использованы следующие определения.

При использовании некоторого оборудования ряд параметров, например отношение сигнал/шум, может быть рассчитано с помощью программного обеспечения, поставляемого производителем. На пользователе лежит ответственность за соответствие способов расчётов, используемых в программном обеспечении, требованиям Фармакопеи. В противном случае должны быть сделаны соответствующие исправления.

Хроматограмма

Хроматограмма представляет собой графическое или иное представление сигнала детектора на концентрацию веществ в элюате или другой количественной величины, используемой для измерения концентрации веществ в элюате, относительно времени, объёма или расстояния. Идеализированные хроматограммы представлены сочетанием гауссовских пиков и базовой линии (базовой линии).

ПАРАМЕТРЫ УДЕРЖИВАНИЯ

Время удерживания и удерживаемый объём

Измерения удерживания в элюентной хроматографии могут быть представлены временем удерживания (t_R), определённом непосредственно по положению максимума пика на хроматограмме. Из времени удерживания может быть рассчитан удерживаемый объём (V_R).

$$V_R = t_R v$$

t_R – время удерживания или расстояние, измеренное по базовой линии от точки ввода пробы до перпендикуляра, опущенного из максимума пика, соответствующего компоненту,

v – объёмная скорость подвижной фазы.

Концентрационный коэффициент распределения

Концентрационный коэффициент распределения (D_m) (также известный как коэффициент ёмкости *k'* или фактор удерживания k) определяется как:

$$D_m = \frac{количество \cdot вещества \cdot в \cdot неподвижной \cdot фазе}{количество \cdot вещества \cdot в \cdot подвижной \cdot фазе} = K_C \frac{V_S}{V_M}$$

K_C – коэффициент распределения,

V_S – объём неподвижной фазы,

V_M – объём подвижной фазы.

Значение D_m компонента может быть определено из хроматограммы при использовании выражения:

$$D_m = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

t_R – время удерживания (или объём) или расстояние, измеренное по базовой линии от точки ввода пробы до перпендикуляра, опущенного из максимума пика, соответствующего компоненту,

t_M – «мёртвое» время (или объём): время (или объём) или расстояние, измеренное по базовой линии от точки ввода пробы до перпендикуляра, опущенного из максимума пика, соответствующего неудерживаемому компоненту.

Коэффициент распределения

Характеристика элюирования в эксклюзионной хроматографии может быть представлена коэффициентом распределения (K_0), который рассчитывают с помощью выражения:

$$K_0 = \frac{t_R - t_0}{t_t - t_0}$$

t_R – время удерживания (или объём) или расстояние, измеренное по базовой линии от точки ввода пробы до перпендикуляра, опущенного из максимума пика, соответствующего компоненту,

t_0 – «мёртвое» время (или объём): время (или объём) или расстояние, измеренное по базовой линии от точки ввода пробы до перпендикуляра, опущенного из максимума пика, соответствующего неудерживаемому компоненту,

t_t – время удерживания (или объём) или расстояние, измеренное по базовой линии от точки ввода пробы до перпендикуляра, опущенного из максимума пика, соответствующего компоненту, который полностью проникает в поры неподвижной фазы.

Фактор удерживания (подвижности)

Фактор удерживания (подвижности R_F), используемый в плоскостной хроматографии, представляет собой отношение расстояния от точки нанесения пробы до центра пятна и расстояния, пройденного фронтом растворителя от точки нанесения пробы.

$$R_F = \frac{b}{a}$$

b – расстояние, пройденное веществом,

a – расстояние, пройденное фронтом растворителя.

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ

Пик может быть охарактеризован *площадью пика (A)* или *высотой пика (h)* и *шириной пика на половине высоты* (w_h) или *высотой пика (h)* и *шириной пика между точками перегиба* (w_i). Для гауссовских пиков (Рисунок 2.2.46.-1) справедливо соотношение:

$$w_h = 1{,}18 w_i$$

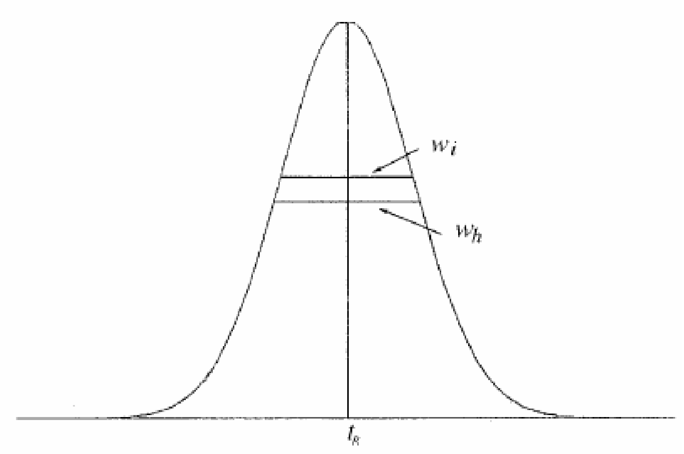


Рисунок 2.2.46.-1.

Фактор асимметрии

Фактор асимметрии пика (A_s) (Рисунок 2.2.46.-2) рассчитывается из выражения:

$$A_s = \frac{w_{0,05}}{2d}$$

$w_{0,05}$ – ширина пика на одной двадцатой высоты,

d – расстояние между перпендикуляром, опущенным из максимума пика и передним краем пика на одной двадцатой высоты.

Если фактор ассиметрии равен 1,0 – это означает полную (идеальную) симметрию.

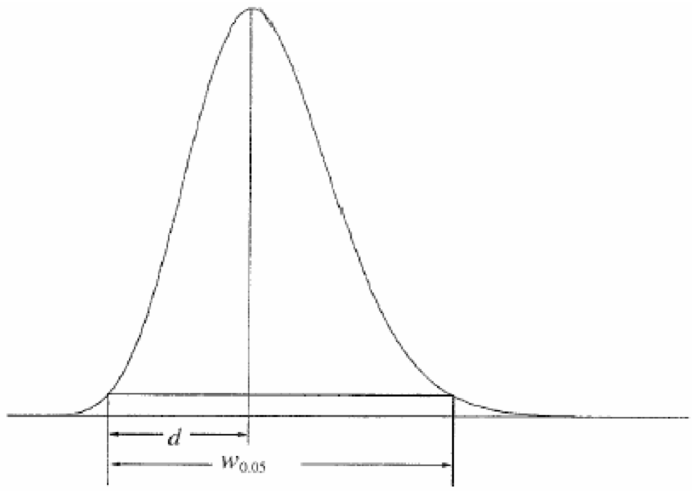


Рисунок 2.2.46.-2.

Эффективность колонки и число теоретических тарелок

Эффективность колонки, в зависимости от метода, может быть рассчитана из данных, полученных как при изотермическом, изократическом режимах, так и при режиме постоянной плотности, как число теоретических тарелок (*n*) из следующего выражения, в котором величины t_R и w_h должны быть выражены в одинаковых единицах (время, объём или расстояние).

$$N = 5{,}54\left(\frac{t_R}{w_h}\right)^2$$

t_R – время удерживания (или объём) или расстояние, измеренное по базовой линии от точки ввода пробы до перпендикуляра, опущенного из максимума пика, соответствующего компоненту,

w_h – ширина пика на половине высоты.

Число теоретических тарелок зависит от компонента, колонки и времени удерживания.

ПАРАМЕТРЫ РАЗДЕЛЕНИЯ

Разрешение

Разрешение (R_s) близких по высоте пиков двух компонентов может быть рассчитано из выражения:

$$R_s = \frac{1{,}18(t_{R_2} - t_{R_1})}{w_{h_1} + w_{h_2}}$$

$$t_{R_2} > t_{R_1}$$

t_{R1} и t_{R2} – времена удерживания или расстояния, измеренное по базовой линии от точки ввода пробы до перпендикуляров, опущенных из максимумов двух соседних пиков,

w_{h1} и w_{h2} – ширина пиков на половине высоты.

Разрешение более 1,5 соответствует разделению пиков до базовой линии.

Выражение, приведенное выше, не может быть использовано в случае, когда пики сильно различаются по высоте.

В количественной плоскостной хроматографии вместо времён удерживания используются пройденные расстояния, и разрешение может быть рассчитано с использованием выражения:

$$R_S = \frac{1{,}18a(R_{F_2} - R_{F_1})}{w_{h_1} + w_{h_2}}$$

R_{F1} и R_{F2} – отношения расстояний от точки нанесения пробы до центров пятен и расстояния, прошедшего фронтом растворителя от точки нанесения пробы (фактор подвижности),

w_{h1} и w_{h2} – ширина пиков на половине высоты,

a – расстояние, прошедшее фронтом растворителя.

Коэффициент разделения пиков

Коэффициент разделения неполностью разделённых пиков (*p/v*-параметр) может быть использован в качестве требования пригодности хроматографической системы при выполнении испытания на родственные соединения в случае неполного отделения примеси от анализируемого вещества (аналита) (Рисунок 2.2.46.-3).

$$p/v = \frac{H_p}{H_v}$$

Hp – высота пика примеси относительно экстраполированной базовой линии,

Hv – расстояние между экстраполированной базовой линией и нижней точкой кривой, разделяющей пики примеси и аналита.

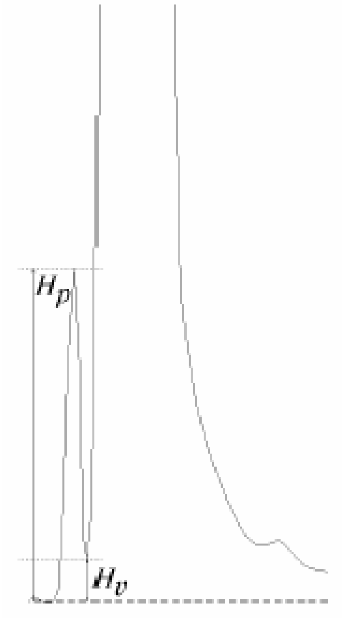


Рисунок 2.2.46.-3.

Относительное удерживание

Относительное удерживание (*r*) рассчитывается из выражения:

$$r = \frac{t_{R_2} - t_M}{t_{R_1} - t_M}$$

t_{R2} – время удерживания интересующего пика,

t_{R1} – время удерживания пика сравнения (обычно пик, соответствующий исследуемому веществу),

t_M – «мёртвое» время (или объём): время (или объём) или расстояние, измеренное по базовой линии от точки ввода пробы до перпендикуляра, опущенного из максимума пика, соответствующего неудерживаемому компоненту.

В плоскостной хроматографии вместо t_{R2} и t_{R1} используются факторы подвижности R_{F2} и R_{F1}.

ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ (ПРЕЦИЗИОННОСТЬ) КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Отношение сигнал/шум

Отношение сигнал/шум (*S/N*) влияет на воспроизводимость (прецизионность) количественного определения и рассчитывается из уравнения:

$$\frac{S}{N} = \frac{2H}{h}$$

H – высота пика (Рисунок 2.2.46.-4), соответствующая рассматриваемому компоненту, на хроматограмме, полученной при использовании рекомендованного раствора сравнения, измеренная от максимума пика до экстраполированной базовой линии для сигнала, величина которого эквивалентна двадцатикратному превышению величины ширины пика на половине высоты,

h – размах для фонового шума (уровень шума) на хроматограмме, полученной при введении или нанесении холостой пробы, величина которого эквивалентна двадцатикратному превышению щирины пика на половине высоты для пика на хроматограмме, полученной при использовании рекомендованного раствора сравнения и, если возможно, расположенного на одном и том же расстоянии от места возможного обнаружения пика.

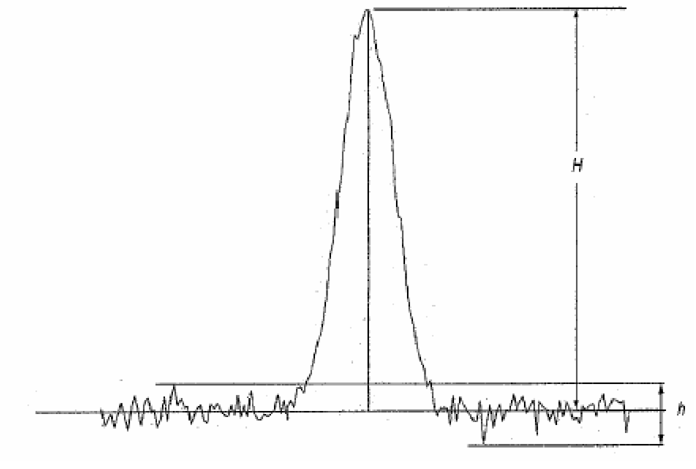


Рисунок 2.2.46.-4.

Сходимость (повторяемость)

Сходимость (повторяемость) отклика выражается в виде рассчитанного процентного относительного стандартного отклонения (*RSD* %) последовательных серий измерений с участием исследуемой пробы или раствора сравнения и рассчитывается из выражения:

$$RSD_{\%} = \frac{100}{\bar{y}} \sqrt{\frac{\sum (y_i - \bar{y})^2}{n-1}}$$

y_i – индивидуальные значения площади пика, высоты пика или отношения площадей в методе внутреннего стандарта,

$\bar{y}$ – среднее индивидуальных значений,

n – число индивидуальных значений.

Максимальное допустимое относительное стандартное отклонение (RSD_{max}) рассчитывается для серии измерений с участием исследуемой пробы или раствора сравнения для определённых пределов с использованием следующего выражения:

$$RSD_{\max} = \frac{KB\sqrt{n}}{t_{90\%,n-1}}$$

K – константа (0,349), полученная из выражения

$$K = \frac{0{,}6}{\sqrt{2}} \times \frac{t_{90\%,5}}{\sqrt{6}}$$

в котором $\frac{0.6}{\sqrt{2}}$ соответствует требуемому *RSD* при 6 измерениях для B=1,0,

B – верхний предел, приведенный в определении в частной статье минус 100 процентов, предполагая, что верхний предел установлен согласно воспроизводимости методики,

n– число повторных измерений для раствора сравнения ($3 \le n \le 6$),

$t_{90\%,n-1}$– коэффициент Стьюдента *t* для 90%-ной доверительной вероятности (двухсторонняя критическая область) с *n* - 1 степеней свободы.

ПРИГОДНОСТЬ СИСТЕМЫ

Тесты на определение пригодности системы являются неотъемлемой частью методики и используются для того, чтобы удостовериться в адекватном функционировании хроматографической системы. Для оценки работы колонки обычно используются следующие параметры: эффективность, концентрационный коэффициент распределения, разрешение, относительное удерживание и фактор асимметрии.

На хроматографическое поведение могут влиять такие факторы, как состав, ионная сила, температура и pH подвижной фазы, скорость потока, длина колонки, температура, давление, а также характеристики неподвижной фазы: пористость, размер частиц, удельная площадь поверхности, а в случае обращённой фазы –

степень химической модификации (блокирование концевых групп, число атомов углерода и т.д.).

Различные компоненты используемого оборудования должны быть проверены на соответствие их качества и должны обладать точностью измерений требуемой для проведения испытания или количественного определения.

Должны быть соблюдены следующие требования при отсутствии других указаний в частной статье.

- Величина фактора асимметрии основного пика должна находиться в пределах от 0,8 до 1,5, если только нет иных указаний в частной статье. Данное требование распространяется как на тесты, так и на количественные определения, описанные в частных статьях.

- Максимальное допустимое относительное стандартное отклонение для повторных измерений для предписанного раствора сравнения не должно превышать величин, приведенных в Таблице 2.2.46.-1. Данное требование распространяется только на количественное определение вещества и не используется в случае проведения испытания на родственные соединения.

- Предел обнаружения пика (соответствующий отношению сигнал/шум равному 3) находится ниже допустимого содержания примеси (порога, ниже которого присутствие примеси отрицается) в тесте на родственные соединения.

- Предел количественного определения пика (соответствующий отношению сигнал/шум равному 10) равен или меньше, чем порог обнаружения примесей (порог, при котором отрицается присутствие примеси) в тесте на родственные соединения.

Таблица 2.2.46.-1.

Требования к сходимости (повторяемости)

	Число индивидуальных измерений (вводов проб)			
	3	4	5	6
B, %	Максимальное допустимое относительное стандартное отклонение			
2,0	0,41	0,59	0,73	0,85
2,5	0,42	0,74	0,92	1,06
3,0	0,62	0,89	1,10	1,27

РЕГУЛИРОВАНИЕ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ УСЛОВИЙ

В качестве информации ниже приведены интервалы, в пределах которых могут изменяться различные параметры хроматографических испытаний, без принципиального изменения методики, для того, чтобы удовлетворять критериям пригодности системы. Описанные хроматографические условия были валидированы в процессе подготовки этой статьи. Проверка пригодности системы включена для того, чтобы гарантировать требуемое разделение для удовлетворительного проведения теста или количественного определения. Неподвижные фазы описаны только в общем виде, так как существует огромное количество их доступных коммерческих разновидностей, отличающихся по хроматографическому поведению и для того, чтобы достигнуть предписанных требований пригодности системы, в ряде случаев приходится вносить некоторые изменения в хроматографические условия. В методиках обращено-фазовой

хроматографии, в особенности, регулирование различных параметров не всегда приводит к удовлетворительному разделению. В этом случае может возникнуть необходимость заменить одну колонку другой, обеспечивающей желаемое хроматографическое поведение, такого же типа (например, октадецилсиликагель), но от другого производителя.

Регулирование критических параметров для гарантии пригодности системы чётко указывается в частной статье.

Следует избегать множественных изменений условий, которые могут оказать совместное влияние на эффективность системы.

Тонкослойная и бумажная хроматография

Состав подвижной фазы: количество растворителя, содержание которого в смеси минимально, может изменяться в пределах ±30% (относительное содержание) или ±2% (абсолютное содержание), в зависимости от того, что больше. Абсолютное содержание других компонентов не может быть изменено более, чем на 10%.

pH водного компонента подвижной фазы: ± 0,2 pH, если только иное не указано в частной статье, или ± 1,0 pH в случаях исследования нейтральных веществ.

Концентрация солей в буферном компоненте подвижной фазы: ±10%.

Наносимый объём: уменьшается на 20% от требуемого объёма при использовании пластинок с мелким размером частиц (2-10 мкм).

Расстояние перемещения фронта растворителя не должно быть меньше, чем 50 мм.

Жидкостная хроматография

Состав подвижной фазы: количество растворителя, содержание которого в смеси минимально, может изменяться в пределах ±30% (относительное содержание) или ±2% (абсолютное содержание) в зависимости от компонента, которого больше. Абсолютное содержание других компонентов не может быть изменено более, чем на 10%.

pH водного компонента подвижной фазы: ±0,2 pH, при отсутствии других указаний в частной статье, или ±1,0 pH в случаях исследования нейтральных веществ.

Концентрация солей в буферном компоненте подвижной фазы: ±10%.

Длина волны детектора: изменения не допускаются.

Неподвижная фаза:

- *длина колонки*: ± 70%,

- *внутренний диаметр колонки*: ± 25%,

- *размер частиц*: максимальное уменьшение на 50%, увеличение не допускается.

Скорость потока: ± 50%.

Температура: ± 10%, максимум при 60°C.

Вводимый объём пробы: может быть уменьшен, при условии того, что используемое детектирование и сходимость пика (пиков) остаются удовлетворительными.

Градиентное элюирование: конфигурация используемого оборудования может значительно изменить разрешение, время удерживания или относительные удерживания, описанные в методике. Это может быть вызвано чрезмерной величиной объёма, между точкой встречи двух элюентов и входом в колонку.

Газовая хроматография

Неподвижная фаза:

- *длина колонки*: ±70%,
- *внутренний диаметр колонки*: ±50%,
- *размер частиц*: максимальное уменьшение на 50%, увеличение не допускается,
- *толщина плёнки* : от - 50% до + 100%.

Скорость потока: ±50%.

Температура: ±10%.

Вводимый объём пробы: может быть уменьшен, при условии того, что используемое детектирование и повторяемость остаются удовлетворительными.

Сверхкритическая флюидная хроматография

Состав подвижной фазы: для набивных колонок количество растворителя, содержание которого в смеси минимально, может изменяться в пределах ±30% (относительное содержание) или ±2% (абсолютное содержание), в зависимости от компонента, которого больше. Для капиллярной колонки изменения не допускаются.

Длина волны детектора: изменения не допускаются.

Неподвижная фаза:

- *длина колонки*: ±70%,
- *внутренний диаметр колонки*:

±25% (набивные колонки),

±50% (капиллярные колонки),

- *размер частиц*: максимальное уменьшение на 50%, увеличение не допускается (набивные колонки).

Скорость потока: ±50%.

Температура: ±10%.

Вводимый объём пробы: может быть уменьшен, при условии того, что используемое детектирование и повторяемость остаются удовлетворительными.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Метод внешнего стандарта. Концентрация анализируемого компонента (компонентов) определяется путём сравнения сигнала (сигналов) (пика (пиков)),

полученного для исследуемого раствора, и сигнала (сигналов) (пика(пиков)), полученного для раствора сравнения.

Метод внутреннего стандарта. В исследуемый раствор и раствор сравнения вводятся одинаковые количества компонента (внутреннего стандарта), который разделяется с исследуемым веществом и не взаимодействует с ним. Концентрация исследуемого вещества определяется путём сравнения отношения площадей или высот пиков, соответствующих исследуемому веществу и внутреннему стандарту, для анализируемого раствора и отношения площадей или высот пиков, соответствующих исследуемому веществу и внутреннему стандарту, для раствора сравнения.

Методика нормализации. Процентное содержание одного или большего числа компонентов исследуемого вещества рассчитывается путём определения площади пика или пиков, как процентной части общей площади всех пиков, исключая пики, соответствующие растворителям или любым добавленным реагентам и тем веществам, содержание которых ниже допустимого предельного содержания.

Методика градуировки. Определяют связь между измеренным или рассчитанным сигналом *(y)* и количеством (концентрацией, массой и т.д.) определяемого вещества *(x)* и рассчитывают уравнение градуировочной функции. Аналитические результаты рассчитывают из измеренного или рассчитанного сигнала с помощью обратной функции.

Для количественных определений основного вещества и компонентов в частных статьях обычно используются методы внешнего и внутреннего стандартов или методика градуировки; методика нормализации обычно не применяется. При проведении испытаний на родственные соединения обычно применяют метод внешнего стандарта с одним раствором сравнения либо методику нормализации. Вместе с тем, при использовании как методики нормализации, так и метода внутреннего стандарта, в случае если для сравнения используются разбавления исследуемого раствора, сигналы для родственных веществ должны быть близки к сигналу самого вещества (*фактор соответствия* от 0,8 до 1,2), в противном случае в тесте должны быть указаны величины *поправочных факторов*, обратных факторам соответствия.

Фактор соответствия представляет собой относительную величину, равную соответствию равных масс родственных веществ при условиях, описанных в тесте.

Если испытание на родственные соединения предписывает определение общего содержания примесей либо подразумевает количественное определение примеси, важно выбрать подходящую величину порога и подходящие условия сложения площадей пиков. В таких испытаниях *допустимый предел,* т.е. площади пиков, которые лежат ниже предела и не принимаются во внимание, обычно равен 0,05%. Таким образом, пороговая величина в случае сложения величин соответствует, по крайней мере, половине допустимого предела. Сложение площадей пиков примесей, которые не полностью разделяются с основным пиком, лучше всего проводить экстраполяцией. Пики, соответствующие растворителям, используемым для растворения образца, также не принимаются во внимание.

2.2.47. КАПИЛЛЯРНЫЙ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ

ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ

Капиллярный электрофорез – это физический метод анализа, основанный на миграции внутри капилляра заряженных аналитов, растворённых в растворе электролита, под влиянием постоянного электрического поля.

Скорость миграции аналита под влиянием электрического поля с напряжённостью *E* определяется электрофоретической подвижностью аналита и электроосмотической подвижностью буферного раствора внутри капилляра. Электрофоретическая подвижность вещества (μ_{ep}) зависит от его свойств (электрический заряд, размер и форма молекул) и от свойств буферного раствора, в котором происходит процесс миграции (тип и ионная сила электролита, pH, вязкость и наличие добавок). Электрофоретическая скорость (v_{ep}) вещества, частицы которого принимаются за сферические, описывается уравнением:

$$v_{ep} = m_{ep} \cdot E = \left(\frac{q}{6phr}\right) \cdot \left(\frac{V}{L}\right),$$

где:

q – эффективный заряд вещества,

η – вязкость раствора электролита,

r –Стоксовский радиус частиц вещества,

V – приложенное напряжение,

L – общая длина капилляра.

При помещении капилляра, заполненного буферным раствором, в электрическое поле внутри капилляра начинается перемещение растворителя, называемое электроосмотическим потоком. Скорость электроосмотического потока зависит от электроосмотической подвижности (μ_{eo}), которая, в свою очередь, зависит от плотности заряда на внутренней стенке капилляра и свойств буферного раствора. Электроосмотическая скорость (v_{eo}) определяется уравнением:

$$v_{eo} = m_{eo} \cdot E = \left(\frac{ez}{h}\right) \cdot \left(\frac{V}{L}\right),$$

e □ – диэлектрическая постоянная буферного раствора,

ζ – дзета-потенциал поверхности капилляра

Скорость вещества (v) определяется как:

$$v = v_{ep} + v_{eo}$$

В зависимости от заряда вещества электрофоретическая подвижность аналита и электроосмотическая подвижность могут быть направлены одинаково или противоположно. В условиях нормального капиллярного электрофореза анионы перемещаются в направлении, противоположном направлению электроосмотического потока, а их скорости меньше электроосмотической скорости. Катионы мигрируют в направлении, совпадающем с направлением электроосмотического потока, а их скорости превышают электроосмотическую скорость. В условиях, когда электроосмотическая скорость превышает электрофоретическую, катионы и анионы могут быть разделены в течение одного анализа.

Время (*t*), необходимое веществу для миграции на расстояние (*l*) от конца капилляра, в который вводится вещество, до точки детекции (эффективная длина капилляра), определяется выражением:

$$t = \frac{l}{v_{ep} + v_{eo}} = \frac{l \times L}{(m_{ep} + m_{eo})V}$$

В общем, при pH более 3 капилляры с немодифицированной поверхностью, изготовленные из плавленого кварца, имеют отрицательный заряд, обусловленный ионизацией силанольных групп, расположенных на внутренней стенке капилляра. Соответственно, электроосмотический поток направлен от анода к катоду. Если необходимо получить хорошую воспроизводимость скорости миграции веществ, электроосмотический поток должен оставаться постоянным. В некоторых случаях требуется уменьшить или устранить электроосмотический поток путём модификации внутренней стенки капилляра или изменения концентрации, состава и/или pH буферного раствора.

После введения исследуемой пробы в капилляр каждый ион аналита, входящего в состав пробы, мигрирует в среде фонового электролита согласно своей электрофоретической подвижности как независимая зона. Дисперсия зоны, представляющая собой расширение полосы каждого вещества, является следствием различных явлений. При идеальных условиях вклад в процесс расширения зоны вещества вносит только молекулярная диффузия вещества вдоль капилляра (продольная диффузия). В этом идеальном случае эффективность зоны, выражаемая как число теоретических тарелок (*n*), определяется как:

$$n = \frac{(m_{ep} \pm m_{eo}) \cdot V \cdot l}{2 \cdot D \cdot L},$$

где:

D – коэффициент молекулярной диффузии вещества в буферном растворе.

На практике значительный вклад в дисперсию полосы вносят процессы тепловой конвекции, адсорбции образца на стенках капилляра, а также неодинаковая проводимость между образцом и буферным раствором, длина устройства для ввода пробы, размер ячейки детектора и расположение ёмкостей с буферными растворами на разных уровнях.

Разделение двух полос (выражаемое как разрешение, *Rs*) может быть достигнуто при изменении электрофоретической подвижности аналитов либо электроосмотической подвижности, а также при увеличении эффективности полосы для каждого аналита, согласно уравнению:

$$R_S = \frac{\sqrt{N(m_{epb} - m_{epa})}}{4(\overline{m}_{ep} + m_{eo})},$$

где:

m_{epa} и m_{epb} – электрофоретические подвижности двух разделяемых аналитов,

$\overline{m}_{ep}$ – средняя электрофоретическая подвижность двух аналитов $\overline{m}_{ep} = \frac{1}{2}(m_{epb} + m_{epa})$.

АППАРАТУРА

Прибор для капиллярного электрофореза состоит из:

- управляемого высоковольтного источника постоянного тока;

- двух резервуаров с буферными растворами, расположенных на одном и том же уровне и содержащих предписанные анодный и катодный растворы;

- двух электродов (катода и анода), погружённых в резервуары с буферными растворами и соединённых с источником тока;

- капилляра, в котором проводится разделение (обычно изготовленного из плавленого кварца); при использовании некоторых типов детекторов капилляр имеет оптическое окошко, расположенное на уровне детектора. Концы капилляра помещены в резервуары с буферными растворами. Капилляр заполнен раствором, указанным в частной статье;

- подходящей системы ввода пробы;

- детектора, способного контролировать количество определяемых веществ, проходящих через разделяющий сегмент капилляра в течение определённого времени; детекция обычно основана на абсорбционной спектрофотометрии (в УФ- и видимой областях) или флуориметрии, в ряде случаев может быть использовано также кондуктометрическое, амперометрическое или масс-спектрометрическое детектирование; альтернативным способом детекции веществ, которые не поглощают УФ-излучение и не флуоресцируют, является непрямое детектирование;

- для получения хорошо воспроизводимых результатов разделения рекомендуется использовать термостат, способный поддерживать постоянную температуру внутри капилляра;

- самописца и походящего интегратора или компьютера.

Описание процесса ввода пробы и его автоматизация являются критическими факторами для точного количественного анализа. Ввод пробы может быть основан на использовании силы тяжести, давления, вакуума и электрокинетических сил. Количество каждого компонента образца, введённого электрокинетически, зависит от его электрокинетической подвижности, что приводит к возможным неравным условиям для разных веществ при использовании данного режима ввода пробы.

Используют капилляр, буферные растворы, способ пробоподготовки и создания условий анализа, раствор пробы и условия миграции, указанные в частной статье для исследуемого вещества. Применяемый раствор электролита фильтруют для удаления твёрдых частиц и дегазируют для предотвращения образования пузырьков, мешающих работе детектора и созданию электрического контакта в капилляре во время процесса разделения. Для обеспечения воспроизводимых значений времени миграции веществ для каждой аналитической методики должна быть разработана методика тщательной промывки системы.

КАПИЛЛЯРНЫЙ ЗОННЫЙ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ

ПРИНЦИП

В капиллярном зонном электрофорезе аналиты разделяются в капилляре, содержащем только буферный раствор без антиконвективной среды. В данном методе разделение происходит вследствие того, что различные компоненты образца мигрируют с различной скоростью в виде отдельных полос. Скорость перемещения каждой полосы зависит от электрофоретической подвижности вещества и электроосмотического потока в капилляре (см. Общие принципы). Для

улучшения разделения веществ, адсорбирующихся на кварцевой поверхности, могут быть использованы капилляры с модифицированной поверхностью.

При использовании данной разновидности капиллярного электрофореза может быть осуществлён анализ как малых (M_r < 2000), так и больших молекул (2000 < M_r < 100 000). Благодаря высокой эффективности капиллярного электрофореза в свободном растворе может быть проведено разделение молекул, имеющих очень незначительные различия в величинах отношений заряда к массе. При добавлении к разделяющему буферному раствору хиральных селекторов данный способ разделения позволят разделять хиральные соединения.

ОПТИМИЗАЦИЯ

Оптимизация разделения является комплексным процессом, в котором основную роль могут играть несколько параметров разделения. Основными факторами, которые следует принимать во внимание при разработке методик разделения, являются инструментальные параметры, а также параметры раствора электролита.

Инструментальные параметры

Напряжение. Время разделения обратно пропорционально приложенному напряжению. Однако увеличение напряжения может вызвать избыточное выделение тепла, повышение температуры и, как результат, образование градиентов вязкости в буферном растворе, находящемся в капилляре. Данный эффект приводит к расширению полосы и уменьшению разрешения.

Полярность. Полярность электродов может быть нормальной (анод на входе и катод на выходе), электроосмотический поток при этом перемещается по направлению к катоду. В случае обращённой полярности электродов электроосмотический поток направлен от выхода из капилляра и только заряженные аналиты с электрофоретическими подвижностями превышающими величину электрофоретического потока попадают к выходу.

Температура. Температура влияет, главным образом, на вязкость и электрическую проводимость и, как следствие, на скорость миграции. В некоторых случаях увеличение температуры капилляра может вызвать конформационные изменения в молекулах белков, что изменяет их времена миграции и эффективность разделения.

Капилляр. Размеры капилляра (длина и внутренний диаметр) влияют на время анализа, эффективность разделения и загрузочную ёмкость. Увеличение как эффективной, так и общей длины капилляра может ослабить электрическое поле (в случае работы при постоянном напряжении), что приводит к увеличению времени миграции. Для определённого буферного раствора и электрического поля тепловая конвекция и, следовательно, расширение полос образца зависит от величины внутреннего диаметра капилляра. Последняя также влияет на предел обнаружения, зависящий от объёма введённой пробы и применяемого детектора.

Поскольку адсорбция компонентов образца на стенке капилляра влияет на эффективность, при разработке методики разделения должны быть предложены способы предотвращения таких взаимодействий. В некоторых случаях, касающихся белков, были предложены способы, позволяющие избежать адсорбции на стенке капилляра. Некоторые из таких способов (использование экстремальных pH и адсорбция положительно заряженных буферных добавок) для предотвращения адсорбции белков требуют лишь изменения состава буферной смеси. В других способах внутренняя стенка капилляра покрывается полимером, ковалентно

связанным с поверхностью, что предотвращает взаимодействия между белками и отрицательно заряженной поверхностью кварца. Для этих целей выпускаются готовые к использованию капилляры с покрытиями, состоящими из нейтральных гидрофильных, катионных или анионных полимеров.

Параметры раствора электролита

Тип и концентрация буферного раствора. Буферные растворы, подходящие для капиллярного электрофореза, имеют соответствующую буферную ёмкость в выбранном диапазоне pH и низкую подвижность для уменьшения образования тока.

Подбор соответствующей подвижности буферного иона по отношению к подвижности исследуемого вещества важен для уменьшения возможного изменения полосы. Тип растворителя, использованного для растворения определяемого вещества, также важен для достижения фокусирования вещества на колонке, что увеличивает эффективность разделения и улучшает детекцию.

Увеличение концентрации буферного раствора (для данной величины pH) уменьшает электроосмотический поток и скорость вещества.

Величина pH буферного раствора. Величина pH буферного раствора может влиять на разделение вследствие изменения заряда аналита или добавок, а также электроосмотического потока. При разделении белков и пептидов изменение pH буферного раствора от величины, превышающей изоэлектрическую точку (pI), до величины, которая меньше её, изменяет суммарный отрицательный заряд вещества на положительный. Увеличение pH буферного раствора обычно увеличивает электроосмотический поток.

Органические растворители. К водным буферным растворам для увеличения растворимости веществ, а также (или) для изменения степени ионизации компонентов образца могут быть добавлены органические модификаторы (метанол, ацетонитрил и другие). Добавление таких органических модификаторов к буферному раствору обычно вызывает уменьшение электроосмотического потока.

Добавки для хиральных разделений. Для разделения оптических изомеров к разделяющему буферному раствору добавляют хиральный селектор. Наиболее часто используемыми хиральными селекторами являются циклодекстрины, в качестве таких веществ могут быть использованы краун-эфиры, полисахариды и белки. Поскольку хиральное распознавание управляется различными взаимодействиями между хиральным селектором и каждым из энантиомеров, разрешение, достигаемое для хиральных соединений, зависит, главным образом, от типа использованного хирального селектора. В этом отношении при разработке методик определённых разделений может оказаться полезным использование циклодекстринов с различным размером полостей (α-, β- или γ-циклодекстрин) либо модифицированных циклодекстринов с нейтральными (метил-, этил-, гидроксиалкил и другие) или способными к ионизации (аминометил-, карбоксиметил-, сульфобутиловые эфиры и другие) группами. При использовании модифицированных циклодекстринов следует принимать во внимание различия в степени замещения между разными партиями данных веществ, поскольку это может оказывать влияние на селективность. Другими факторами, контролирующими разрешение при хиральных разделениях, являются концентрация хирального селектора, состав и pH буферного раствора, а также температура. Достигнутую величину разрешения также может изменять использование органических добавок, таких как метанол или мочевина.

КАПИЛЛЯРНЫЙ ГЕЛЬ-ЭЛЕКТРОФОРЕЗ

ПРИНЦИП

В капиллярном гель-электрофорезе разделение происходит внутри капилляра, заполненного гелем, который действует как молекулярное сито. Поскольку более малые молекулы легче проникают в структуру геля и мигрируют быстрее, чем большие молекулы, разделение молекул с близкими величинами отношения заряда к массе происходит в соответствии с их размерами. Таким образом, методом капиллярного гель-электрофореза согласно величинам молекулярных масс могут быть разделены различные биологические макромолекулы (например, белки и фрагменты ДНК), часто имеющие близкие величины отношения заряда к массе.

ХАРАКТЕРИСТИКИ ГЕЛЕЙ

В капиллярном электрофорезе используют гели двух типов: химически модифицированные и динамически модифицированные. Химически модифицированные гели, такие как поперечно-сшитый полиакриламид, получают полимеризацией мономеров внутри капилляра. Они обычно химически связаны с поверхностью плавленого кварца и не могут быть удалены без разрушения капилляра. Если гели используются для анализа белков, разделяющий буфер обычно содержит натрия додецилсульфат и пробы перед вводом денатурируют нагреванием в смеси натрия додецилсульфата и 2-меркаптоэтанола или дитиотреитола. В случае анализа интактного антитела 2-меркаптоэтанол и дитиотреитол не применяют. Разделение с помощью поперечно-сшитых гелей может быть улучшено при изменении буферного раствора, используемого при разделении (как указано в разделе, посвящённом капиллярному зонному электрофорезу), и контролировании пористости геля во время его получения. Для поперечно-сшитых полиакриламидных гелей пористость может быть модифицирована путём изменения концентрации акриламида и/или пропорции сшивающего реагента. Как правило, уменьшение пористости геля приводит к уменьшению подвижности разделяемых веществ. Вследствие жёсткости подобных гелей может быть использован только электрокинетический ввод пробы.

Динамически модифицированные гели представляют собой гидрофильные полимеры, такие как линейный полиакриламид, производные целлюлозы, декстран и другие, которые могут растворяться в водных буферных растворах, используемых при разделении, образуя разделяющую среду, которая также действует как молекулярное сито. Такие разделяющие среды получить легче, чем поперечно-сшитые полимеры. Они могут быть приготовлены в пробирке и помещены под давлением в капилляр с модифицированной поверхностью (без электроосмотического потока). Удаление геля после каждого ввода пробы обычно улучшает воспроизводимость разделения. Пористость гелей может быть увеличена при использовании полимеров с большей молекулярной массой (при определённой концентрации полимера) или путём уменьшения концентрации полимера (при определённой молекулярной массе полимера). Уменьшение пористости геля приводит к уменьшению подвижности вещества для того же самого буферного раствора. Поскольку растворение таких полимеров в буферном растворе даёт

растворы с низкой вязкостью, может быть использован как гидродинамический, так и электрокинетический ввод пробы.

КАПИЛЛЯРНОЕ ИЗОЭЛЕКТРИЧЕСКОЕ ФОКУСИРОВАНИЕ

ПРИНЦИП

При изоэлектрическом фокусировании молекулы мигрируют под влиянием электрического поля до тех пор, пока они остаются заряжёнными, в градиенте pH, создаваемом амфолитами, имеющими широкий диапазон значений pI (полиаминокарбоновые кислоты), растворёнными в буферном растворе.

Тремя основными стадиями изоэлектрического фокусирования являются загрузка, фокусирование и мобилизация.

Стадия загрузки. Могут быть использованы два способы:

- одноступенчатая загрузка: проба смешивается с амфолитами и вводится в капилляр под давлением или с помощью вакуума;

- последовательная загрузка: в капилляр вводят вначале ведущий буферный раствор, затем амфолиты, затем пробу, смешанную с амфолитами, после чего снова амфолиты и в конце замыкающий буферный раствор. Объём пробы должен быть таким, чтобы не повлиять на величину градиента pH.

Стадия фокусирования. При наложении напряжения амфолиты, в зависимости от своего заряда, мигрируют по направлению к катоду или аноду, тем самым создавая градиент от анода (более низкие pH) к катоду (более высокие pH). Во время данной стадии разделяемые компоненты мигрируют до тех пор, пока не достигнут pH, соответствующего своей изоэлектрической точке, и ток не упадёт до очень низких значений.

Стадия мобилизации. Если для детекции необходима мобилизация, используют один из следующих способов:

- в первом способе мобилизация проводится в течение стадии фокусирования вследствие действия электроосмотического потока. Электроосмотический поток должен быть достаточно малым, чтобы позволить провести фокусирование компонентов;

- во втором способе мобилизация проводится после стадии фокусирования путём использования положительного давления;

- в третьем способе мобилизация проводится после стадии фокусирования путём добавления солей в катодный или анодный резервуар (в зависимости от направления, выбранного для мобилизации) для изменения pH в капилляре при наложении напряжения. Поскольку pH изменяется, белки и электролиты перемещаются по направлению к резервуару, который содержит добавленные соли, и проходят через детектор.

Достигаемое разделение, выраженное как ΔpI, зависит от градиента pH (dpH/dx), числа амфолитов, имеющих различные величины pI, коэффициента молекулярной диффузии (D), напряжённости электрического поля (E) и того, как изменяется электрофоретическая подвижность аналита при изменении pH ($-d\mu/dpH$):

$$\Delta pI = 3 \cdot \sqrt{\frac{D(dpH : dx)}{E(-dm : dpH)}}$$

ОПТИМИЗАЦИЯ

Основными параметрами, которые следует учитывать при разработке методик разделения, являются:

Напряжение. В капиллярном изоэлектрическом фокусировании на стадии фокусирования используются электрические поля с очень высокой напряжённостью - от 300 В/см до 1000 В/см.

Капилляр. В зависимости от способа мобилизации (см. выше) электроосмотический поток должен быть уменьшен или подавлен. Капилляры с модифицированной поверхностью склонны уменьшать электроосмотический поток.

Растворы. Резервуар с анодным буферным раствором заполняют раствором, pH которого меньше, чем pI большинства кислотных амфолитов, а катодный резервуар – раствором, pH которого больше, чем pI большинства основных амфолитов. Для анода часто используют фосфорную кислоту, а для катода – гидроксид натрия.

Добавление полимера, такого как метилцеллюлоза, в раствор амфолита приводит к подавлению конвективных сил (если такие имеются) и электроосмотического потока, что обусловлено увеличением вязкости. Имеющиеся в продаже амфолиты покрывают множество диапазонов pH, при необходимости получить более широкий диапазон pH их можно смешивать. Широкие диапазоны pH используются для оценки величины изоэлектрической точки, в то время как более узкие применяются для улучшения точности анализа. Для градуировки можно использовать зависимость между временем миграции и изоэлектрической точкой для серии белковых маркеров.

Если необходимо, осаждение белков в изоэлектрической точке во время стадии фокусирования может быть предотвращено с помощью добавления к буферному раствору глицерина, поверхностно-активных веществ, мочевины или цвиттерионных буферных растворов. Следует иметь в виду, что мочевина в зависимости от концентрации денатурирует белки.

МИЦЕЛЛЯРНАЯ ЭЛЕКТРОКИНЕТИЧЕСКАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ (МЭКХ, МЕКС)

ПРИНЦИП

В мицеллярной электрокинетической хроматографии разделение происходит в растворе электролита, который содержит поверхностно-активное вещество в концентрации, превышающей критическую концентрацию мицеллообразования (*ккм*). Молекулы растворённого вещества распределяются между водным буферным раствором и псевдонеподвижной фазой, образованной мицеллами, в соответствии со своим коэффициентом распределения. Таким образом, данный метод можно рассматривать как гибрид электрофореза и хроматографии. Он может быть использован для разделения как заряженных, так и нейтральных веществ и сохраняет эффективность, скорость и оборудование, присущие капиллярному электрофорезу. Одним из поверхностно-активных веществ, широко используемым в МЭКХ, является анионное поверхностно активное вещество натрия додецилсульфат. Применяются также и другие поверхностно-активные вещества, например, катионные поверхностно-активные вещества, такие как соли цетилтриметиламмония.

Механизм разделения заключается в следующем. В нейтральной или щелочной среде возникает сильный электроосмотический поток, который перемещает ионы буферного раствора, используемого при разделении, по направлению к катоду. Если в качестве поверхностно-активного вещества используется натрия додецилсульфат электрофоретическая миграция анионных мицелл происходит в противоположном направлении, т.е. к аноду. В результате общая скорость миграции мицелл уменьшается по сравнению с потоком раствора электролита. В случае нейтральных разделяемых веществ, поскольку аналит способен распределяться между мицеллой и водным буферным раствором и не имеет электрофоретической подвижности, скорость миграции аналита будет зависеть только от величины его коэффициента распределения между мицеллой и водным буферным раствором. На электрофореграмме пики, соответствующие каждому из разделяемых незаряженных веществ, всегда находятся между пиком маркера электроосмотического потока и пиком мицеллы (время между этими двумя пиками называется окном разделения). Для заряженных разделяемых веществ скорость миграции зависит как от коэффициента распределения вещества между мицеллой и водным буферным раствором, так и от электрофоретической подвижности вещества в отсутствии мицеллы.

Поскольку механизм разделения в МЭКХ для нейтральных и слабо ионизированных веществ, главным образом, хроматографический, миграция вещества и разрешение могут быть охарактеризованы с помощью фактора удерживания вещества (*k*), также известного как концентрационный коэффициент распределения (*D*m), который представляет собой отношение количество разделяемого вещества, находящегося в мицелле, к количеству данного вещества в подвижной фазе.

Для нейтральных соединений *k* определяется как:

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0 \times \left(1 - \frac{t_R}{t_{mc}}\right)} = K \times \frac{V_S}{V_M},$$

где:

t_R – время миграции вещества,

t_0 – время анализа неудерживаемого соединения (определяемое с помощью маркера электроосмотического тока, не входящего в мицеллу, например, метанола),

t_{mc} – время миграции мицеллы (изменяется с помощью маркера мицеллы, такого как Судан III, который мигрирует, полностью находясь в мицеллах),

K – коэффициент распределения вещества,

V_S – объём мицеллярной фазы,

V_M – объём подвижной фазы.

Аналогично, разрешение пиков двух близко мигрирующих веществ определяется как:

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \frac{a-1}{a} \cdot \frac{k_b}{k_b + 1} \cdot \frac{1 - \left(\frac{t_0}{t_m}\right)}{1 + k_a \cdot \left(\frac{t_0}{t_{mc}}\right)},$$

где:

N – число теоретических тарелок для одного из веществ,

α – селективность,

k_a и k_b – факторы удерживания для обоих веществ соответственно ($k_b > k_a$).

Подобные, но не идентичные, уравнения для значений *k* и *Rs* используются и в случае разделения заряженных веществ.

ОПТИМИЗАЦИЯ

Основными параметрами, которые следует принимать во внимание при разработке методик разделения в МЭКХ, являются инструментальные параметры, а также параметры раствора электролита.

Инструментальные параметры

Напряжение. Время разделения обратно пропорционально приложенному напряжению. Однако увеличение напряжения может вызвать избыточное выделение тепла, повышение температуры и, как результат, образование градиентов температуры и вязкости в буферном растворе, находящемся в капилляре. Данный эффект особенно характерен для буферных растворов с высокой электропроводностью и содержащих мицеллы. Неудовлетворительная тепловая конвекция приводит к расширению полосы и уменьшает разрешение.

Температура. Изменения температуры капилляра влияют на коэффициент распределения вещества между буферным раствором и мицеллой, на критическую концентрацию мицеллообразования и вязкость буферного раствора. Данные параметры вносят вклад в величину времени удерживания вещества. Использование хорошей охлаждающей системы улучшает воспроизводимость времен миграции веществ.

Капилляр. Как и в случае капиллярного электрофореза со свободным раствором размеры капилляра (длина и внутренний диаметр) влияют на время анализа и эффективность разделения. Увеличение как эффективной, так и общей длины капилляра может ослабить электрическое поле (в случае работы при постоянном напряжении), увеличить время миграции и улучшить эффективность разделения. Внутренний диаметр контролирует тепловую конвекцию (для определённого буферного раствора и электрического поля) и, соответственно, расширению полосы вещества.

Параметры раствора электролита

Тип и концентрация поверхностно-активного вещества. Тип поверхностно-активного вещества таким же образом, как и неподвижная фаза в хроматографии, влияет на разрешение, поскольку изменяет селективность разделения. Величина lg *k* нейтрального соединения линейно увеличивается при увеличении концентрации поверхностно-активного вещества в подвижной фазе. Поскольку разрешение в МЭКХ достигает максимума при приближении величины *k* к $\sqrt{t_{mc} : t_0}$, изменение концентрации поверхностно-активного вещества в подвижной фазе изменяет величину разрешения.

Величина pH буферного раствора. Несмотря на то что величина pH не изменяет коэффициент распределения неионизированных веществ, она может

изменять электроосмотический поток в капиллярах с немодифицированной поверхностью. Уменьшение pH буферного раствора уменьшает электроосмотический поток и, тем самым, увеличивает разрешение нейтральных веществ в МЭКХ вследствие увеличения времени анализа.

Органические растворители. Для улучшения МЭКХ-разделения гидрофобных соединений к раствору электролита могут быть добавлены органические модификаторы (метанол, пропанол, ацетонитрил и другие). Добавление этих модификаторов обычно уменьшает время миграции и селективность разделения. Поскольку добавление органических модификаторов влияет на величину критической концентрации мицеллообразования, определённая концентрация поверхностно-активного вещества может быть использована только в пределах некоторого процентного содержания органического модификатора до прекращения мицеллообразования или отрицательного влияния на этот процесс, приводящего к исчезновению мицелл и прекращению разделения. Диссоциация мицелл в присутствии большого количества органического растворителя не всегда означает невозможность дальнейшего разделения; в некоторых случаях гидрофобное взаимодействие между мономером ионного поверхностно-активного вещества и нейтральным разделяемым веществом приводит к образованию сольвофобных комплексов, которые могут быть разделены электрофоретически.

Добавки для хиральных разделений. Для разделения энантиомеров с использованием МЭКХ хиральный селектор включается в мицеллярную систему либо ковалентно связывается с поверхностно-активным веществом, либо добавляется к раствору электролита, в которм происходит разделение мицелл. Мицеллы, способные к хиральным разделениям, обычно включают в себя соли N-додеканоил-L-аминокислот, соли желчных кислот и т.д. Хиральное разделение может быть также проведено с помощью циклодекстринов, добавленных к растворам электролитов, содержащих мицеллы ахиральных поверхностно-активных веществ.

Другие добавки. Существует ряд подходов, предполагающих добавление различных реагентов к буферному раствору для изменения селективности. Добавление некоторых типов циклодекстринов к буферному раствору также может быть использовано для уменьшения взаимодействия гидрофобных веществ с мицеллой, тем самым увеличивая селективность разделения для такого типа соединений.

Добавление веществ, которые способны изменять взаимодействия между разделяемым веществом и мицеллой вследствие адсорбции на последней, используется для улучшения селективности разделения в МЭКХ. Данные добавки могут представлять собой второе поверхностно-активное вещество (ионное или неионное), которое увеличивает количество смешанных мицелл или катионов металлов, которые растворяются в мицелле и образуют координационные комплексы с разделяемыми веществами.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Пики должны быть разделены соответствующими временами миграции, чтобы в итоге получить исправленную площадь, позволяющую:

- компенсировать смещения времен удерживания от анализа к анализу, тем самым уменьшить различия в величине отклика,

-компенсировать различные отклики компонентов пробы с различными временами миграции.

При использовании внутреннего стандарта следует убедиться в том, что пик исследуемого вещества не скрыт аналогичным пиком внутреннего стандарта.

РАСЧЁТЫ

По полученным данным рассчитывают содержание исследуемого компонента или компонентов. Если требуется, рассчитывают процентное содержание одного или нескольких компонентов образца путём определения исправленной площади пика или пиков, как процентной части исправленных площадей всех пиков, исключая пики, соответствующие растворителям или любым добавленным реагентам (метод нормализации). Рекомендуется использование автоматической системы интеграции (интегратора или системы получения и обработки данных)

ПРИГОДНОСТЬ СИСТЕМЫ

Параметры пригодности системы используются для проверки поведения системы капиллярного электрофореза. Выбор этих параметров зависит от используемой разновидности капиллярного электрофореза. К ним относятся: фактор удерживания (*k*) (только для мицеллярной электрокинетической хроматографии), число теоретических тарелок (*N*), фактор симметрии (*As*) и разрешение (*Rs*). В предыдущих разделах были описаны уравнения для расчётов *N* и *Rs*, ниже приведены уравнения, позволяющие рассчитать эти параметры из электрофореграмм.

ЧИСЛО ТЕОРЕТИЧЕСКИХ ТАРЕЛОК

Число теоретических тарелок (*N*) может быть рассчитано с помощью выражения:

$$N = 5{,}54\left(\frac{t_R}{w_h}\right)^2,$$

где:

t_R – время миграции или расстояние по базовой линии от точки ввода пробы до перпендикуляра, опущенного из максимума пика, соответствующего компоненту,

w_h – ширина пика на половине высоты.

РАЗРЕШЕНИЕ

Разрешение (R_s) близких по высоте пиков двух компонентов может быть рассчитано из выражения:

$$R_s = \frac{1{,}18(t_{R_2} - t_{R_2})}{w_{h_1} + w_{h_2}}$$

$$t_{R_2} > t_{R_1},$$

где:

t_{R1} и t_{R2} – времена миграции или расстояния по базовой линии от точки ввода пробы до перпендикуляров, опущенных из максимумов двух соседних пиков,

w_{h1} and w_{h2} – ширина пиков на половине высоты.

При необходимости может быть измерена высота седловины (H_v) между двумя частично разделёнными пиками в стандартном образце, а также высота меньшего пика (H_p) и рассчитана величина коэффициента разделения неполностью разделённых пиков:

$$\frac{p}{v} = \frac{H_p}{H_v}$$

ФАКТОР СИММЕТРИИ

Фактор симметрии пика (A_s) рассчитывается из выражения:

$$A_s = \frac{w_{0,05}}{2d}$$

$w_{0,05}$ – ширина пика на одной двадцатой высоты,

d – расстояние между перпендикуляром, опущенным из максимума пика и передним краем пика на одной двадцатой высоты.

Испытания на повторяемость площадей (стандартное отклонение площадей или отношений площадь/время миграции) и времен миграции (стандартное отклонение времени миграции) используются в качестве параметров пригодности. Повторяемость времени миграции обеспечивает испытание методики промывки капилляра. Альтернативным способом предупреждения ухудшения повторяемости времени миграции является использование отношения времени миграции относительно внутреннего стандарта.

Для определения родственных соединений может быть полезно испытание на подтверждение отношения сигнал/шум для стандартного образца (или определение предела количественного определения).

ОТНОШЕНИЕ СИГНАЛ/ШУМ

Пределы обнаружения и количественного определения отвечают отношению сигнал/шум, соответственно, 3 и 10. Отношение сигнал/шум (S/N) рассчитывается из выражения:

$$\frac{S}{N} = \frac{2H}{h},$$

где:

H – высота пика, соответствующая рассматриваемому компоненту, на электрофореграмме, полученной при использовании рекомендованного раствора сравнения. Высота пика измерена от максимума пика до экстраполированной базовой линии для сигнала, величина которого эквивалентна двадцатикратному превышению ширины пика на половине высоты,

h – размах для фонового шума (уровень шума) на электрофореграмме, полученной при введении контрольной пробы. Величина эквивалентна двадцатикратному превышению ширины пика на половине высоты для пика на электрофореграмме, полученной при использовании рекомендованного раствора сравнения и, если возможно, расположенного на одном и том же расстоянии от места возможного обнаружения пика.

2.2.48. РАМАНОВСКАЯ СПЕКТРОМЕТРИЯ (# СПЕКТРОМЕТРИЯ КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ)

Рамановская спектрометрия (неупругое рассеяние света) – это процесс рассеяния света, при котором исследуемый образец облучается интенсивным монохроматическим светом (обычно излучение лазера) и для света, рассеиваемого образцом, определяется сдвиг частоты.

Рамановская спектрометрия является дополнительным методом по отношению к ИК-спектрометрии, в том смысле, что оба этих метода основаны на молекулярных колебаниях частиц исследуемого вещества. Однако рамановская и ИК-спектрометрия отличаются по относительной чувствительности для различных функциональных групп. Рамановская спектрометрия особенно чувствительна к неполярным связям (например, одинарные или кратные связи С-С), тогда как вода, для которой характерно сильное поглощение в ИК-области, обладает слабым рамановским рассеянием и поэтому хорошо подходит на роль растворителя в рамановской спектрометрии.

Прибор. Спектрометры для получения рамановских спектров обычно состоят из следующих компонентов:

- источник монохроматического света, чаще всего лазер с длиной волны в ультрафиолетовой, видимой или ближней инфракрасной области,

- подходящая оптика (линзы, зеркала, световоды), которые направляют возбуждающее излучение на образец и собирают свет, рассеиваемый образцом,

- оптическое устройство (монохроматор или фильтр), которое пропускает сдвинутое по частоте рамановское рассеяние и препятствует попаданию на детектор интенсивного света, частота которого равна частоте возбуждающего света (рэлеевское рассеяние),

- диспергирующее устройство (дифракционная решётка или призма), соединённое со щелью, регулирующей длину волны, и детектором (обычно фотоумножитель),

или:

- диспергирующее устройство (дифракционная решётка или призма), соединённое с многоканальным детектором (обычно прибор с зарядовой связью (ПЗС, CCD)),

или:

- интерферометр, регистрирующий интенсивность рассеянного света во времени, и устройство обработки данных, которое с помощью фурье-преобразования преобразует данные в диапазон частот или волновых чисел.

ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦА

Рамановские спектры могут быть получены для твёрдых веществ, жидкостей и газов, причём как напрямую, так и помещенных в стеклянные контейнеры или трубки, как правило, без предварительной подготовки образца или растворения.

Основным ограничением рамановской спектрометрии является флуоресценция примесей, которая мешает детектору улавливать значительно более слабый рамановский сигнал. Флуоресценции можно избежать при использовании в качестве возбуждающего света лазерного излучения с большой длиной волны, например, находящейся в ближней инфракрасной области. Интенсивность некоторых рамановских линий может быть усилена несколькими способами, например, путём использования резонансной рамановской спектрометрии (RR) или усиленной поверхностью рамановской спектрометрии (SERS).

Из-за узости светового потока падающего лазерного излучения, для получения спектра необходимо всего лишь несколько микролитров образца. Тем не менее, следует учитывать неоднородность образца, если только его объём не увеличен, например, путём вращения образца.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ВЕЩЕСТВ СРАВНЕНИЯ

Исследуемое вещество и вещество сравнения подвергают одинаковой обработке и затем при одинаковых условиях получают их спектры. Максимумы в спектре исследуемого вещества совпадают по положению и интенсивности с соответствующими максимумами в спектре вещества сравнения (CRS).

Если спектры, полученные для твёрдых веществ, имеют различия в положениях максимумов, исследуемое вещество и вещество сравнения подвергают одинаковой обработке для того, чтобы они выкристаллизовались или образовались в одинаковой форме, либо поступают так, как описано в частной статье, и затем снимают спектры.

Поскольку закон Бера-Ламберта для рамановской спектроскопии не выполняется, интенсивность рамановского излучения прямо пропорциональна концентрации рассеивающих частиц. Как и в случае других спектроскопических методов количественное определение может быть проведено с использованием известных количеств или концентраций веществ сравнения. Вследствие небольшого пространственного разрешения метода следует обращать внимание на качество исследуемых образцов и образцов сравнения, например, необходимо быть уверенным в том, что они находятся в одном и том же физическом состоянии, либо использовать внутренний стандарт для жидких образцов.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СПЕКТРАЛЬНЫХ БИБЛИОТЕК И СТАТИСТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ КЛАССИФИКАЦИИ И ГРАДУИРОВКИ

Контроль за работой прибора. При использовании прибора следуют инструкциям производителя; регулярно, в зависимости от применения прибора и исследуемых веществ, проводят предписанные градуировки и испытания работы системы. При использовании рамановской спектрометрии для количественных определений либо при создании спектральных библиотек сравнения для (хемометрической) классификации или градуировки необходимо обращать особое внимание на то, чтобы были сделаны все поправки в измерения либо предприняты

меры для контроля за изменяемостью величин волновых чисел и интенсивности сигнала прибора.

Подтверждение шкалы волновых чисел. Шкалу волновых чисел рамановских сдвигов (обычно выражаемую в обратных сантиметрах) подтверждают с помощью подходящих стадартов, которые имеют характерные максимумы при исследуемых величинах волновых чисел, например, органическое вещество, неоновая лампа или линии Ar^+ плазмы из аргон-ионного лазера.

Градуировка прибора должна соответствовать типу образца, т.е. для твёрдых исследуемых образцов следует использовать твёрдые образцы сравнения, а для жидких – жидкие. Выбирают подходящее вещество (например, инден, циклогексан или нафталин), для которого установлены точные значения сдвигов волновых чисел. Образец индена, для предотвращения его разрушения, помещают в пробирку для ЯМР, вакуумируют и затем хранят в атмосфере инертного газа, в прохладном и тёмном месте.

Таблица 2.2.48.-1

Сдвиги волновых чисел (и допустимые отклонения) для циклогексана, индена и нафталина.

циклогексан [A]	инден [B]	нафталин [A]
		3056.4 (± 1.5)
2938.3 (± 1.5)		
2923.8 (± 1.5)		
2852.9 (± 1.5)		
	1609.7 (± 1.0)	1576.6 (± 1.0)
1444.4 (± 1.0)	1552.6 (± 1.0)	1464.5 (± 1.0)
1266.4 (± 1.0)	1205.2 (± 1.0)	1382.2 (± 1.0)
1157.6 (± 1.0)		1147.2 (± 1.0)
1028.3 (± 1.0)	1018.6 (± 1.0)	1021.6 (± 1.0)
801.3 (± 1.0)	730.5 (± 1.0)	763.8 (± 1.0)
	533.9 (± 1.0)	513.8 (± 1.0)

[A] *Standard guide for Raman shift standards for spectrometer calibration* (American Society for Testing and Materials ASTM E 1840).

[B] D. A. Carter, W. R. Thompson, C. E. Taylor and J. E. Pemberton, *Applied Spectroscopy*, 1995, 49 (11), 1561-1576.

Подтверждение шкалы интенсивностей. На абсолютную и относительную интенсивность рамановских полос могут оказывать влияние следующие факторы:

- состояние поляризации падающего света,
- состояние поляризации собирающей оптики,
- интенсивность падающего света,

- различия в отклике прибора,
- различия в фокусе и геометрии образца,
- различия в насыпной плотности для твёрдых образцов.

Подходящие критерии приемлемости могут изменяться в зависимости от применения, но в большинстве случаев допустимы колебания в относительных интенсивностях полос ±10%.

Создание спектральных библиотек сравнения. Снимают спектры подходящего числа полностью исследованных (например, так как описано в монографии) материалов, которые имеют отличия в производителе, серии, кристаллической модификации, размерах частиц и т.д., типичные для анализируемого материала. Набор спектров даёт информацию, которая определяет границы подобия или количественного определения, которые могут быть использованы для того, чтобы, например, идентифицировать вещество или проконтролировать его количество, образовавшееся в процессе производства. Число веществ в базе данных зависит от особенностей её применения. Коллекция спектров в базе данных может быть представлена различными способами, определяемыми математической методикой, используемой для классификации или количественного определения.

Селективность базы данных, которая позволяет положительно идентифицировать данный материал либо достоверно отличить его от других материалов, содержащихся в базе данных, должна быть установлена во время процедуры валидации. Для уверенности в пригодности базы данных эта селективность должна регулярно проверяться; в особенности это необходимо делать после любых значительных изменений, произошедших с веществом (например, изменение поставщика или производственного процесса), либо при настройке прибора для рамановской спектрометрии (например, при подтверждении шкалы волновых чисел или воспроизводимости отклика спектрометра)

База данных пригодна только для исходного прибора, либо для подобного прибора при условии определения того, что перенесенная на прибор база данных остаётся пригодной.

Метод. Подготовку и исследование образца проводят таким же образом, как и при создании базы данных. Для облегчения сравнения спектров и количественных расчётов могут быть использованы подходящие математические преобразования рамановских спектров.

Сравнение или преобразования спектров, количественный прогноз свойств веществ, находящихся в исследуемом материале, могут проводиться с использованием подходящих методов хемометрики, статистической классификации и градуировки.

2.2.54. ИЗОЭЛЕКТРИЧЕСКОЕ ФОКУСИРОВАНИЕ

ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ

Изоэлектрическое фокусирование (ИЭФ, IEF) – это вариант электрофореза, в котором разделение белков происходит в соответствии с их изоэлектрическими точками. Разделение проводится на пластине из полиакриламида или агарозного геля, содержащего смесь амфотерных электролитов (амфолитов). При действии электрического поля амфолиты мигрируют в геле, создавая градиент pH. В некоторых случаях используют гели, имеющие фиксированный градиент pH, полученные путём включения слабых кислот или оснований в определённые места

геля во время его приготовления. Когда нанесённые белки достигают фракции геля, которая имеет такое же значение pH, что и их изоэлектрическая точка (pI), заряд данных белков нейтрализуется и миграция прекращается. Градиенты могут быть созданы в различных диапазонах pH в зависимости от выбранной смеси амфолитов.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ

В изоэлектрической точке молекула белка незаряжена и не может передвигаться в матрице геля под действием электрического поля. Её перемещение, однако, может происходить в результате диффузии. Градиент pH вынуждает белок оставаться в изоэлектрическом состоянии, концентрируя данное вещество. Такое концентрирование называется «фокусирование». Увеличение приложенного напряжения или уменьшение количества нанесённого вещества улучшает разделение полос. Величина приложенного напряжения ограничена выделяющейся теплотой, которая должна быть рассеяна. Использование тонких слоёв геля, а также пластин с эффективным охлаждением, контролируемых термостатирующим устройством, предотвращает возгорание геля и в тоже время обеспечивает точное фокусирование. Разделение оценивают по минимальной разности pI (ΔpI), которая необходима для разделения двух соседних полос:

$$\Delta pI = 3 \cdot \sqrt{\frac{D(dpH : dx)}{E(-dm : dpH)}},$$

где:

D – коэффициент диффузии белка,

$\frac{dpH}{dx}$ – градиент pH,

E – напряжённость электрического поля, в вольтах на сантиметр,

$-\frac{dm}{dpH}$ – изменение подвижности вещества при изменение pH в диапазоне pH близком к pI.

Поскольку *D* и $-\frac{dm}{dpH}$ для определённого белка не могут быть изменены, улучшить разделение можно при использовании более узкого диапазона pH либо при увеличении напряжённости электрического поля.

Разрешение между полосами белков в случае использования ИЭФ-геля, содержащего ведущие амфолиты, достаточно хорошее. Улучшить разрешение можно при использовании фиксированных градиентов pH, для создания которых применяются буферные вещества, аналогичные ведущим электролитам, сополимеризованные с матрицей геля. При использовании геля, содержащего ведущие электролиты, могут быть разделены белки, значения pI которых отличаются на 0,02 единицы pH, в то время как фиксированные градиенты pH позволяют разделить белки, изоэлектрические точки которых различаются приблизительно на 0,001 pH.

ПРАКТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ

Следует уделять особое внимание характеристикам и/или подготовке образца. Наличие солей в образце может вызвать ряд проблем, поэтому лучше

всего при приготовлении образца использовать деионизированную воду или 2%-ный раствор амфолитов, используя при необходимости диализ или гель-фильтрацию.

Время, необходимое для завершения фокусирования в тонком слое полиакриламидных гелей, определяют путём нанесения окрашенного белка (например, гемоглобина) в различные области поверхности геля и применения электрического поля: стабильное состояние достигается тогда, когда все нанесения дают идентичный образец полос.

В некоторых протоколах о завершении фокусирования судят по времени, прошедшему после нанесения образца.

ИЭФ может быть использовано в качестве испытания на идентичность, В этом случае исследуемый образец, мигрирующий на геле, сравнивается с подходящим стандартным образцом и ИЭФ-градуировочными белками. ИЭФ может быть использовано в качестве испытания на предельное содержание. При этом плотность полосы на ИЭФ сравнивается соответственно с полосой на ИЭФ, появляющейся при использовании стандартного образца. Если плотность измеряют с помощью денситометра или аналогичного устройства, позволяющего определить относительную концентрацию белка в полосе. ИЭФ может быть также использовано при испытании на количественное содержание белков.

Прибор. Прибор для ИЭФ состоит из:

- управляемого генератора для создания постоянного потенциала, тока и мощности; используются потенциалы величиной 2500 В, они считаются оптимальными для используемых условий работы; рекомендуется источник тока, имеющий постоянную мощность до 30 Вт;

- жесткая пластиковая ИЭФ камера, в которой находится охлаждаемая пластинка или подходящий материал, служащий основой для нанесения геля;

- пластиковая крышка с платиновыми электродами, которые соединены с гелем с помощью бумажных фитилей подходящей ширины, длины и толщины, пропитанных растворами анодных и катодных электролитов.

ИЗОЭЛЕКТРИЧЕСКОЕ ФОКУСИРОВАНИЕ В ПОЛИАКРИЛАМИДНЫХ ГЕЛЯХ:

ПОДРОБНАЯ МЕТОДИКА

Следующая методика представляет собой подробное описание процедуры ИЭФ в пластинах полиакриламидного геля, используемой, если иное не указано в монографии.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ГЕЛЕЙ

Матрица формования. Матрица формования (см. Рисунок 2.2.54.-1) состоит из стеклянной пластинки (А,) на которую для облегчения работы с гелем помещена полиэфирная плёнка (В), одной или нескольких распорных деталей (С), второй стеклянной пластинки (D) и зажимов, скрепляющих всю конструкцию.

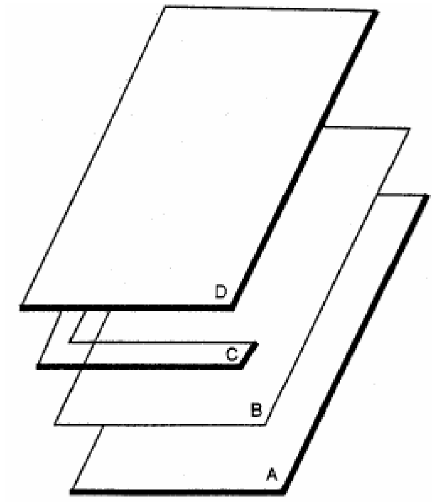


Рисунок 2.2.54.-1 – Матрица формования

7,5%-ный полиакриламидный гель. Растворяют 29,1 г *акриламида R* и 0,9 г *метиленбисакриламида R* в 100 мл *воды R*. К 2,5 объёмам этого раствора прибавляют смесь амфолитов, указанных в частной статье, и разбавляют до 10 мл *водой R*. Раствор аккуратно перемешивают и дегазируют.

Приготовление формы. Полиэфирную плёнку помещают на нижнюю стеклянную пластинку, вставляют распорную деталь, помещают вторую стеклянную пластинку и скрепляют конструкцию зажимами. Перед использованием раствор помещают на магнитную мешалку и прибавляют к нему 0,25 объёма 100 г/л раствора *аммония персульфата R* и 0,25 объёма *тетраметилэтилендиамина R*. Немедленно заполняют раствором пространство между стеклянными пластинками формы.

Методика. Форму разбирают на составные части и, используя полиэфирную плёнку, переносят гель на охлаждённую подложку, увлажнённую несколькими миллилитрами подходящей жидкости, избегая образования воздушных пузырьков. Готовят исследуемый раствор и растворы сравнения как указано в частной статье. Для нанесения образца помещают полоски бумаги размером приблизительно 10 мм × 5 мм на поверхность геля и пропитывают каждую предписанным количеством исследуемого раствора и раствора сравнения. Также наносят предписанное количество раствора белков с известными величинами изоэлектрических точек, служащих в качестве маркеров pH для градуировки геля. В некоторых протоколах вместо использования импрегнированных бумажных полосок используется гель, который имеет желобки, предназначенные для помещения раствора образца. Отрезают 2 полоски бумаги длиной, соответствующей длине геля, и пропитывают их растворами электролитов: кислотой для анода и щелочью для катода. Составы анодного и катодного растворов приводятся в монографиях. Эти бумажные фитильки помещают на каждую сторону геля на расстоянии нескольких миллиметров от его границы. Устанавливают крышку так, чтобы электроды пришли в контакт с полосками бумаги (соответственно анодным и катодным полями). Выполняют изоэлектрическое фокусирование при использовании электрических параметров, описанных в монографии. Когда миграция смеси стандартных белков стабилизируется, электрический ток выключают. С помощью пинцета удаляют полоски, предназначенные для нанесения образца, и 2 электродных фитилька. Погружают гель в *фиксирующий раствор для изоэлектрического фокусирования в полиакриламидном геле R*. Выдерживают при аккуратном встряхивании при

комнатной температуре в течение 30 минут. Удаляют раствор высушиванием и добавляют 200 мл *обесцвечивающего раствора R*. Выдерживают при перемешивании в течение 1 часа. Высушивают гель, добавляют *кумасси окрашивающий раствор R*. Выдерживают в течение 30 минут. Обесцвечивают гель путём пассивной диффузии *обесцвечивающего раствора R* до тех пор, пока на чистом фоне не станут хорошо видны полосы. Отмечают положение и интенсивность полос на электрофореграмме, как указано в монографии.

ИЗМЕНЕНИЯ ПОДРОБНОЙ МЕТОДИКИ (ПРЕДМЕТ ВАЛИДАЦИИ)

Там, где делается ссылка на общую методику изоэлектрического фокусирования, изменения в методологии или методике изоэлектрического фокусирования могут быть предметом валидации. Они включают в себя:

- использование имеющихся в продаже гелей заводского производства, а также окрашивающих и обесцвечивающих наборов,

- использование фиксированных градиентов pH,

- использование стержневых гелей,

- использование кассет геля различных размеров, включая ультратонкие (0,2 мм) гели,

- изменения в методике нанесения образца, включающие различные объёмы образца или использование шаблонов или фитильков, изготовленных не из бумаги,

- использование альтернативных условий перемещения, включающих изменения электрического поля в зависимости от размеров геля и оборудования, а также использование фиксированных времен миграции вместо субъективной интерпретации стабильности полосы,

- включение стадии предварительного фокусирования,

- использование автоматизированного оборудования,

- использование гелей агарозы.

ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИК ИЗОЭЛЕКТРИЧЕСКОГО ФОКУСИРОВАНИЯ

Если используются альтернативные способы по отношению к подробной методике, они должны быть валидированы. Для валидации разделения могут быть использованы следующие критерии:

- образование устойчивого градиента pH с желаемыми характеристиками, оцениваемого, например, с помощью окрашенных маркеров pH с известными величинами изоэлектрических точек,

- сравнение с электрофореграммами, полученными при использовании химического образца сравнения для исследуемого образца,

- любые другие критерии валидации, указанные в монографии.

СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ОБЩЕЙ МЕТОДИКИ

Изменения общей методики, необходимые при анализе некоторых веществ, могут быть подробно описаны в частных статьях. Они включают:

- добавление в гель мочевины (обычно 3 М концентрации достаточно для поддерживания белка в растворённом состоянии, но может быть использована концентрация до 8 М): некоторые белки в изоэлектрической точке выпадают в осадок, в этом случае для того, чтобы белок оставался в растворе в гель вводится мочевина; при использовании мочевины следует применять только свежие её растворы, чтобы не допустить карбамоилирования белка;

- использование альтернативных способов окрашивания;

- использования добавок для геля, таких как неионные детергенты (например, октилглюкозид) или цвиттерионные детергенты (например, CHAPS или CHAPSO), и добавление амфолита к образцу для предотвращения процессов агрегации и преципитации белков.

ПОЛОЖЕНИЯ, КОТОРЫЕ СЛЕДУЕТ ПРИНИМАТЬ ВО ВНИМАНИЕ, ИСПОЛЬЗУЯ ДАННЫЙ МЕТОД

Образцы могут наноситься на любой участок поверхности геля, но для того, чтобы защитить белки от экстремальных величин pH, образцы не должны наносится в непосредственной близости от электродов. В ходе выполнения анализа аналитик может нанести белок на гель в трёх местах (посередине и на обоих концах). Образцы белка, наносимые на противоположные концы геля, могут быть различными.

Известно явление, называемое катодным дрейфом, при котором градиент pH с течением времени разрушается. Это может происходить, если фокусирование в геле происходит слишком долго. Причины данного явления не совсем ясны, но факторами, вызывающими катодный дрейф, могут быть электроэндоосмос и абсорбция диоксида углерода. Для исследования этой проблемы могут быть использованы фиксированные градиенты pH.

В течение фокусирования важно проводить эффективное охлаждение (приблизительно 4°C) ёмкости, в которую помещён гель. Высокие напряжённости электрического поля, используемые во время изоэлектрического фокусирования, могут приводить к перегреванию и влиять на качество фокусируемого геля.

2.3. ПОДЛИННОСТЬ (ИДЕНТИФИКАЦИЯ)

2.3.1. РЕАКЦИИ ПОДЛИННОСТИ (ИДЕНТИФИКАЦИИ) НА ИОНЫ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ГРУППЫ

АЛКАЛОИДЫ

Несколько миллиграммов или указанное в частной статье количество испытуемого образца растворяют в 5 мл воды *Р,* прибавляют *кислоту хлористоводородную разведенную Р* до кислой реакции раствора *(2.2.4),* затем 1 мл *раствора калия йодвисмутата Р,* тотчас образуется оранжевый или оранжево-красный осадок.

АЛЮМИНИЙ

Около 15 мг испытуемого образца растворяют в 2 мл воды *Р.* К полученному раствору или к 2 мл раствора, указанного в частной статье, прибавляют 0,5 мл *кислоты хлористоводородной разведенной Р* и около 0,5 мл *реактива тиоацетамида Р;* осадок не образуется. Затем прибавляют по каплям *раствор натрия гидроксида разведенный Р;* образуется гелеобразный белый осадок, растворяющийся при последующем прибавлении *раствора натрия гидроксида разведенного Р.* К полученному раствору постепенно прибавляют *раствор аммония хлорида Р,* вновь образуется гелеобразный белый осадок.

АМИНЫ АРОМАТИЧЕСКИЕ ПЕРВИЧНЫЕ

Испытуемый раствор, указанный в частной статье, подкисляют *кислотой хлористоводородной разведенной Р,* или 0,05 г испытуемого образца растворяют в *кислоте хлористоводородной разведенной Р* образца прибавляют 0,2 мл *раствора натрия нитрита Р* и через 1-2 мин прибавляют полученный раствор к 1 мл *раствора β-нафтола Р;* появляется интенсивно оранжевое или красное окрашивание и, как правило, образуется осадок такого же цвета.

АММОНИЯ СОЛИ

К испытуемому раствору, указанному в частной статье, прибавляют 0,2 г *магния оксида Р.* Через жидкость пропускают воздух и выходящий воздух направляют в смесь 1 мл *0,1 М раствора кислоты хлористоводородной и* 0,05 мл *раствора метилового красного Р;* окраска индикатора переходит в желтую. Затем прибавляют 1 мл свежеприготовленного раствора 100 г/л *натрия кобальтинитрита Р*; образуется желтый осадок.

АММОНИЯ СОЛИ И СОЛИ ЛЕТУЧИХ ОСНОВАНИЙ

Около 20 мг испытуемоого образца растворяют в 2 мл *воды Р*. К полученному раствору или к 2 мл раствора, указанного в частной статье, прибавляют 2 мл *раствора натрия гидроксида разведенного Р.* При нагревании раствора выделяются пары аммиака, которые обнаруживаются по запаху и щелочной реакции *(2.2.4).*

АЦЕТАТЫ

a) Испытуемый образец нагревают *с* равным количеством *кислоты щавелевой Р;* выделяется кислота уксусная, обнаруживаемая по запаху и кислой реакции *(2.2.4).*

b) Около 30 мг испытуемого образца растворяют в 3 мл *воды Р.* К полученному раствору или к 3 мл раствора, указанного в частной статье, последовательно прибавляют 0,25 мл *раствора лантана нитрата Р,* 0,1 мл *0,05 М раствора йода* и 0,05 мл *раствора аммиака разведенного Р2.* Смесь осторожно нагревают до кипения; в течение нескольких минут образуется синий осадок или появляется синее окрашивание.

c) # К 2 мл нейтрального раствора, содержащего испытуемый образец в количестве, эквивалентном около 20-60 мг ацетат-иона (CH_3COO^-), прибавляют 0,2 мл раствора 30 г/л *железа(III) хлорида* Р; появляется красно-бурое окрашивание, исчезающее при прибавлении кислот минеральных разведенных.

d) # 2 мл раствора, содержащего испытуемый образец в количестве, эквивалентном около 20-60 ацетат-иона (CH_3COO^-), нагревают с равным

количеством *кислоты серной концентрированной* Р и 0,5 мл *спирта Р;* образуется этилацетат, обнаруживаемый по запаху.

АЦЕТИЛ

Около 15 мг или указанное в частной статье количество испытуемоого образца помещают в пробирку длинной около 180 мм и наружным диаметром 18 мм и прибавляют 0,15 мл *кислоты фосфорной Р*. Пробирку закрывают пробкой, через которую пропущена небольшая пробирка длинной около 100 мм и наружным диаметром 10 мм, содержащая *воду Р* и выполняющая роль холодильника. На внешнюю поверхность меньшей пробирки помещяют 1 каплю раствора *лантана нитрата Р*. Если субстанция относительно легко гидролизуется, устройство помещают на 5 мин в водяную баню, затем вынимают меньшую пробирку. Для трудно гидролизуемых субстанций смесь медленно нагревают на открытом пламени до кипения. Каплю снимают, смешивают на фарфоровой пластинке с 0,05 мл *0,01 М раствора йода*. На край капли наносят 0,05 мл *раствора аммиака разведённого Р2*; через 1-2 мин в месте соединения двух капель появляется синее окрашивание, которое усиливается и сохраняется в течение короткого промежутка времени.

БАРБИТУРАТЫ (ЗА ИСКЛЮЧЕНИЕМ N-ЗАМЕЩЕННЫХ)

Около 5 мг испытуемого образца растворяют в 3 мл *метанола Р,* прибавляют 0,1 мл раствора, содержащего 100 г/л *кобальта нитрата Р* и 100 г/л *кальция хлорида Р,* перемешивают и прибавляют при встряхивании 0,1 мл *раствора натрия гидроксида разведенного Р,* появляется фиолетово-синее окрашивание и образуется осадок.

БЕНЗОАТЫ

а) К 1 мл раствора, указанного в частной статье, прибавляют 0,5 мл *раствора железа (III) хлорида Р1;* образуется розовато-желтый осадок, растворимый в *эфире Р*.

b) 0,2 г испытуемого образца, при необходимости измельченного, помещают в пробирку, смачивают 0,2 мл или 0,3 мл *кислоты серной Р,* осторожно нагревают дно пробирки; на внутренних стенках пробирки появляется белый налет.

с) 0,5 г испытуемого образца растворяют в 10 мл *воды Р.* К полученному раствору или к 10 мл раствора, указанного в частной статье, прибавляют 0,5 мл *кислоты хлористоводородной Р;* образуется осадок, который после перекристаллизации из теплой *воды Р* и высушивания *под вакуумом (2.2.32)* имеет *температуру плавления (2.2.14)* от 120°С до 124°С.

БРОМИДЫ

а) Навеску испытуемого образца, содержащую около 3 мг бромид-иона (Br^-), растворяют в 2 мл *воды Р.* Полученный раствор или 2 мл раствора, указанного в частной статье, подкисляют *кислотой азотной разведенной Р,* прибавляют 0,4 мл *раствора серебра нитрата Р1,* перемешивают и отстаивают; образуется светло-желтый творожистый осадок. Осадок отделяют центрифугированием и промывают тремя порциями *воды Р* по 1 мл каждая. Эти операции проводят быстро в защищенном от яркого света месте, при этом допускается, чтобы жидкость над осадком не была полностью прозрачной. Полученный осадок суспендируют в 2 мл *воды Р* и прибавляют 1,5 мл *раствора аммиака Р;* осадок медленно растворяется.

b) Навеску испытуемого образца, эквивалентную около 5 мг бромид-иона (Br^-), или количество образца, указанное в частной статье, помещают в небольшую пробирку, прибавляют 0,25мл *воды Р,* около 75 *мг свинца (IV) оксида Р,* 0,25 мл *кислоты уксусной Р* и осторожно встряхивают. Верхнюю внутреннюю часть пробирки высушивают с помощью фильтровальной бумаги и оставляют на 5 мин. Полоску фильтровальной бумаги необходимого размера пропитывают, помещая ее край в каплю *раствора фуксина обесцвеченного Р* и тотчас помещают пропитанную часть в пробирку. В течение 10 с у нижнего края фильтровальной бумаги появляется фиолетовое окрашивание, которое четко отличается от красной окраски фуксина, наблюдаемой в верхней пропитанной части полоски бумаги.

с) # К 1 мл раствора, содержащего испытуемый образец в количестве, эквивалентном около 2-30 мг бромид-иона (Br^-), прибавляют 1 мл *кислоты*

хлористоводородной разведенной Р, 0,5 мл свежеприготовленного раствора 50 г/л *хлорамина Р*, 1 мл *хлороформа Р* и взбалтывают; хлороформный слой приобретает желто-бурую окраску.

ВИСМУТ

a) 0,5 г испытуемого образца растворяют в 10 мл *кислоты хлористоводородной разведённой Р*. Полученный раствор или 10 мл раствора, указанного в частной статье, кипятят в течение 1 мин, охлаждают и при необходимости фильтруют. К 1 мл полученного раствора прибавляют 20 мл *воды Р*; образуется белый или светло-жёлтый осадок, цвет которого после прибавления от 0,05 мл до 0,1 мл *раствора натрия сульфида Р* изменяется на коричневый.

b) Около 45 мг испытуемого образца растворяют в 10 мл *кислоты азотной разведенной Р.* Полученный раствор или 10 мл раствора, указанного в частной статье, кипятят в течение 1 мин, охлаждают и при необходимости фильтруют. К 5 мл полученного раствора прибавляют 2 мл раствора 100 г/л *тиомочевины Р;* появляется желтовато-оранжевое окрашивание или образуется оранжевый осадок. Затем прибавляют 4 мл раствора 25 г/л *натрия фторида Р;* раствор не обесцвечивается в течение 30 мин.

c) # Навеску испытуемого образца, содержащую около 50 мг иона висмута, взбалтывают с 5 мл *кислоты серной разведенной Р* и фильтруют. К фильтрату прибавляют 2 капли *раствора калия йодида Р1*; образуется черный осадок, растворимый в избытке реактива с образованием раствора желтовато-оранжевого цвета.

ЖЕЛЕЗО

a) Навеску испытуемого образца, содержащую около 10 мг железа-иона (Fe^{2+}), растворяют в 1 мл *воды Р.* К полученному раствору или к 1 мл раствора, указанного в частной статье, прибавляют 1 мл *раствора калия феррицианида Р;* образуется синий осадок, не растворяющийся при прибавлении *кислоты хлористоводородной разведенной Р.*

b) Навеску испытуемого образца, содержащую около 1 мг железа-иона (Fe^{3+}), растворяют в 30 мл *воды Р.* К полученному раствору или к 3 мл раствора, указанного в частной статье, прибавляют 1 мл *кислоты хлористоводородной разведенной Р* и 1 мл *раствора калия тиоцианата Р;* появляется красное окрашивание. Отбирают две порции полученного раствора по 1 мл каждая. К одной порции прибавляют 5 мл *спирта изоамилового Р* или 5 мл *эфира Р,* встряхивают и оставляют до расслоения; органический слой окрашивается в розовый цвет. К другой порции прибавляют 2 мл *раствора ртути (II) хлорида Р;* красное окрашивание раствора исчезает.

c) Навеску испытуемого образца, содержащую не менее 1 мг железа-иона (Fe^{3+}), растворяют в 1 мл *воды Р.* К полученному раствору или к 1 мл раствора, указанного в частной статье, прибавляют 1 мл *раствора калия ферроцианида Р;* образуется синий осадок, не растворяющийся при прибавлении 5 мл *кислоты хлористоводородной разведенной Р.*

ЙОДИДЫ

a) Навеску испытуемого образца, содержащую около 4 мг йодид-иона (I^-), растворяют в 2 мл *воды Р*. Полученный раствор или 2 мл раствора, указанного в частной статье, подкисляют *кислотой азотной разведенной Р,* прибавляют 0,4 мл *раствора серебра нитрата Р1,* перемешивают и отстаивают до образования светло-желтого творожистого осадка. Осадок отделяют центрифугированием и промывают 3 порциями *воды Р* по 1 мл каждая. Эту операцию проводят быстро в защищенном от яркого света месте, при этом допускается, чтобы жидкость над осадком не была полностью прозрачной. Осадок суспендируют в 2 мл *воды Р* и прибавляют 1,5 мл *раствора аммиака Р;* осадок не растворяется.

b) К 0,2 мл раствора испытуемого образца, содержащего около 5 мг йодид-иона (I^-) в 1 мл, или к 0,2 мл раствора, указанного в частной статье, прибавляют 0,5 мл *кислоты серной разведенной Р,* 0,1 мл *раствора калия дихромата Р,* 2 мл *воды Р,* 2 мл *хлороформа Р,* встряхивают в течение нескольких секунд и оставляют до расслоения; хлороформный слой приобретает фиолетовую или фиолетово-красную окраску.

c) # При нагревании 0,1 г испытуемого образца с 1 мл *кислоты серной Р* выделяются фиолетовые пары йода.

КАЛИЙ

а) 0,1 г испытуемого образца растворяют в 2 мл *воды Р.* К полученному раствору или к 2 мл раствора, указанного в частной статье, прибавляют 1 мл *раствора натрия карбоната Р* и нагревают; осадок не образуется. К горячему раствору прибавляют 0,05 мл *раствора натрия сульфида* Р; осадок не образуется. Раствор охлаждают в ледяной воде, прибавляют 2 мл раствора 150 г/л *кислоты винной Р* и отстаивают; образуется белый кристаллический осадок.

b) Около 40 мг испытуемого образца растворяют в 1 мл *воды Р*. К полученному раствору или к 1 мл раствора, указанного в частной статье, прибавляют 1 мл *кислоты уксусной разведенной Р* и 1 мл свеже приготовленного раствора 100 г/л *натрия кобальтинитрита Р;* тотчас образуется желтый или оранжево-желтый осадок.

с) # Соль калия, внесенная в бесцветное пламя, окрашивает его в фиолетовый цвет или при рассматривании через синее стекло - в пурпурно-красный.

КАЛЬЦИЙ

а) К 0,2 мл нейтрального раствора, содержащего испытуемый образец в количестве около 0,2 мг кальций-иона (Ca^{2+}) в 1 мл, или к 0,2 мл раствора, указанного в частной статье, прибавляют 0,5 мл раствора 2 г/л *глиоксальгидроксианила Р* в *спирте Р,* 0,2 мл *раствора натрия гидроксида разведенного Р* и 0,2 мл *раствора натрия карбоната Р.* Смесь встряхивают с 1 мл или 2 мл *хлороформа Р* и прибавляют от 1 мл до 2 мл *воды Р*; хлороформный слой приобретает красную окраску.

b) Около 20 мг или указанное в частной статье количество испытуемого образца растворяют в 5 мл *кислоты уксусной Р.* К полученному раствору прибавляют 0,5 мл *раствора калия ферроцианида Р;* раствор остается прозрачным. К раствору прибавляют около 50 мг *аммония хлорида Р;* образуется белый кристаллический осадок.

с) # К 1 мл раствора, содержащего испытуемый образец в количестве 2-20 мг кальций-иона (Ca^{2+}), прибавляют 1 мл раствора 40 г/л *аммония оксалата Р;* образуется белый осадок, нерастворимый в *кислоте уксусной разведенной Р и растворе аммиака Р,* растворимый в разведенных минеральных кислотах.

d) # Соль кальция, смоченная *кислотой хлористоводородной Р* и внесенная в бесцветное пламя, окрашивает его в оранжево-красный цвет.

КАРБОНАТЫ И ГИДРОКАРБОНАТЫ

а) 0,1 г испытуемого образца помещают в пробирку и суспендируют в 2 мл *воды Р.* К полученной суспензии или к 2 мл суспензии, указанной в частной статье, прибавляют 3 мл *кислоты уксусной разведенной Р.* Пробирку тотчас закрывают притертой пробкой со стеклянной трубкой, дважды изогнутой под прямым углом; наблюдается бурное выделение пузырьков газа без цвета и запаха. Пробирку осторожно нагревают и пропускают выделяющийся газ через 5 мл *раствора бария гидроксида Р;* образуется белый осадок, растворяющийся при прибавлении избытка *кислоты хлористоводородной Р1.*

b) # 0,2 г испытуемого образца растворяют в 2 мл *воды Р.* К полученному раствору прибавляют 0,5 мл насыщенного раствора *магния сульфата Р;* образуется белый осадок (отличие от гидрокарбонатов, растворы которых образуют осадок только при кипячении смеси).

Примечание. Для получения насыщенного раствора магния сульфата, к 100 г *магния сульфата Р* прибавляют 100 мл *воды Р* и оставляют на 24 ч при частом взбалтывании. Раствор фильтруют.

с) # 0,2 г испытуемого образца растворяют в 2 мл *воды Р*. К полученному раствору прибавляют 0,05 мл *раствора фенолфталеина Р;* появляется красное окрашивание (отличие от гидрокарбонатов, растворы которых остаются бесцветными).

КСАНТИНЫ

К нескольким миллиграммам или к указанному в частной статье количеству испытуемого образца прибавляют 0,1 мл *раствора пероксида водорода концентрированного Р,* 0,3 мл *кислоты хлористоводородной разведенной Р* и упаривают на водяной бане до получения сухого желтовато-красного остатка. К остатку прибавляют 0,1 мл *аммиака разведенного Р2;* цвет остатка изменяется на фиолетово-красный.

ЛАКТАТЫ

Навеску испытуемого образца, эквивалентную около 5 мг кислоты молочной, растворяют в 5 мл *воды Р*. К полученному раствору или к 5 мл раствора, указанного в частной статье, прибавляют 1 мл *бромной воды Р,* 0,5 мл *кислоты серной разведенной Р* и нагревают на водяной бане, периодически перемешивая стеклянной палочкой, до обесцвечивания раствора. К раствору прибавляют 4 г *аммония сульфата Р* и перемешивают, прибавляют по каплям, не перемешивая, 0,2 мл раствора 100 г/л *натрия нитропруссида Р* в *кислоте серной разведенной Р,* осторожно прибавляют, также не перемешивая, 1 мл *раствора аммиака концентрированного Р* и отстаивают в течение 30 мин; на границе двух жидкостей образуется темно-зеленое кольцо.

МАГНИЙ

Около 15 мг испытуемого образца растворяют в 2 мл *воды Р*. К полученному раствору или к 2 мл раствора, указанного в частной статье, прибавляют 1 мл *раствора аммиака разведенного Р1;* образуется белый осадок, растворяющийся при прибавлении 1 мл *раствора аммония хлорида Р.* К полученному раствору прибавляют 1 мл *раствора динатрия гидрофосфата Р;* образуется белый кристаллический осадок.

МЫШЬЯК

а) 5 мл испытуемого раствора нагревают на водяной бане с равным объемом *реактива гипофосфита Р;* образуется коричневый осадок.

b) # *Мышьяк (III)* (арсениты). К 0,3 мл раствора, содержащего испытуемый образец в количестве около 30 мг арсенит-иона (AsO_3^{3-}), прибавляют 0,5 мл *кислоты хлористоводородной разведенной Р и* 0,1 мл *раствора натрия сульфида Р;* образуется желтый осадок, нерастворимый в *кислоте хлористоводородной Р,* растворимый в *растворе аммиака Р.*

с) # *Мышьяк (V)* (арсенаты). К 0,3 мл раствора, содержащего испытуемый образец в количестве около 1 мг арсенат-иона (AsO_4^{3-}), прибавляют по 1 мл раствора 100 г/л *аммония хлорида Р, раствора аммиака Р* и раствора 100 г/л *магния сульфата Р,* образуется белый кристаллический осадок, растворимый в *кислоте хлористоводородной разведенной Р* (отличие от арсенитов).

НАТРИЙ

а) 0,1 г испытуемого образца растворяют в 2 мл *воды Р.* К полученному раствору или к 2 мл раствора, указанного в частной статье, прибавляют 2 мл раствора 150 г/л *калия карбоната Р* и нагревают до кипения; осадок не образуется. К раствору прибавляют 4 мл *раствора калия пироантимоната Р* и нагревают до кипения, затем охлаждают в ледяной воде и при необходимости потирают внутренние стенки пробирки стеклянной палочкой; образуется плотный осадок белого цвета.

b) Навеску испытуемого образца, эквивалентную около 2 мг натрий-иона (Na^+), растворяют в 0,5 мл *воды Р.* К полученному раствору или к 0,5 мл раствора, указанного в частной статье, прибавляют *1,5 мл метоксифенилуксусной кислоты реактива Р,* охлаждают в ледяной воде в течение 30 мин; образуется объемный белый кристаллический осадок. Смесь помещают в воду при температуре 20°С и перемешивают в течение 5 мин; осадок не исчезает. К смеси прибавляют 1 мл *раствора аммиака разведенного Р1;* осадок полностью растворяется. К полученному раствору прибавляют 1 мл *раствора аммония карбоната Р;* осадок не образуется.

c) # Соль натрия, смоченная *кислотой хлористоводородной Р* и внесенная в бесцветное пламя, окрашивает его в желтый цвет.

НИТРАТЫ

a) Навеску испытуемого образца, содержащую около 1 мг нитрат-иона (NO_3^-), или количество, указанное в частной статье, прибавляют к смеси 0,1 мл *нитробензола Р* и 0,2 мл *кислоты серной Р* и через 5 мин охлаждают в ледяной воде. Продолжая охлаждение, медленно при перемешивании прибавляют 5 мл *воды Р,* 5 мл *раствора натрия гидроксида концентрированного Р,* 5 мл *ацетона Р,* взбалтывают и отстаивают; верхний слой приобретает темно-фиолетовую окраску.

b) # Раствор, содержащий испытуемый образец в количестве, около 2 мг нитрат-иона (NO_3^-), не обесцвечивает раствор 1 г/л *калия перманганата Р,* подкисленный *кислотой серной разведенной Р* (отличие от нитритов).

\# НИТРИТЫ

a) # Несколько кристаллов антипирина растворяют в фарфоровой чашке в 0,1 мл *кислоты хлористоводородной разведенной Р,* прибавляют 0,1 мл раствора, содержащего около 1 мг нитрит-иона (NO_2^-); появляется зеленое окрашивание (отличие от нитратов).

b) # К навеске испытуемого образца, эквивалентной 30 мг нитрит-иона, прибавляют 1 мл *кислоты серной разведенной Р*; выделяются желто-бурые пары (отличие от нитратов).

РТУТЬ

a) Около 0,1 мл раствора испытуемого образца помещают на тщательно очищенную поверхность медной фольги; появляется темно-серое пятно, которое при натирании становится блестящим. Фольгу высушивают и нагревают в пробирке; пятно исчезает.

b) К раствору, указанному в частной статье, прибавляют *раствор натрия гидроксида разведенный Р до* сильнощелочной среды *(2.2.4);* образуется плотный осадок желтого цвета (ртути II соединений).

c) # К 1 мл раствора, содержащего испытуемый образец в количестве, эквивалентном 10-30 мг ртуть-иона (Hg^{2+}), прибавляют осторожно по каплям *раствор калия йодида Р;* образуется красный осадок, растворимый в избытке этого реактива.

САЛИЦИЛАТЫ

a) К 1 мл раствора, указанного в частной статье, прибавляют 0,5 мл *раствора железа (III) хлорида Р1*; появляется фиолетовое окрашивание, которое не исчезает после прибавления 0,1 мл *кислоты уксусной Р,* # но исчезает при прибавлении *кислоты хлористоводородной разведенной Р;* при этом образуется белый кристаллический осадок салициловой кислоты.

b) 0,5 г испытуемого образца растворяют в 10 мл *воды Р*. К полученному раствору или к 10 мл раствора, указанного в частной статье, прибавляют 0,5 мл *кислоты хлористоводородной Р.* Полученный осадок после перекристаллизации из горячей *воды Р* и высушивания *под вакуумом (2.2.32)* имеет *температуру плавления (2.2.14)* от 156°С до 161°С.

СВИНЕЦ

a) 0,1 г испытуемого образца растворяют в 1 мл *кислоты уксусной Р.* К полученному раствору или к 1 мл раствора, указанного в частной статье, прибавляют 2 мл *раствора калия хромата Р;* образуется желтый осадок, растворяющийся при прибавлении 2 мл *раствора натрия гидроксида концентрированного Р.*

b) 50 мг испытуемого образца растворяют в 1 мл *кислоты уксусной Р.* К полученному раствору или к 1 мл раствора, указанного в частной статье, прибавляют 10 мл *воды Р* и 0,2 мл *раствора калия йодида Р,* образуется желтый осадок. Смесь кипятят в течение 1-2 мин; осадок растворяется. Раствору дают остыть; вновь образуется осадок в виде блестящих желтых пластинок.

СЕРЕБРО

а) Около 10 мг испытуемого образца растворяют в 10 мл *воды Р*. К полученному раствору или к 10 мл раствора, указанного в частной статье, прибавляют 0,3 мл *кислоты хлористоводородной Р1,* образуется белый творожистый осадок, растворяющийся при прибавлении 3 мл *раствора аммиака разведенного Р1.*

b) # К 1 мл раствора испытуемого образца, эквивалентного 5 мг иона серебра, прибавляют *раствор аммиака разведенного Р1* до растворения образующегося вначале осадка, затем прибавляют 2-3 капли *раствора формальдегида Р* и нагревают; на стенках пробирки образуется блестящий налет металлического серебра.

СИЛИКАТЫ

Количество испытуемого образца, указанное в частной статье, смешивают в свинцовом или платиновом тигле с помощью медной проволоки с около 10 мг *натрия фторида Р* и несколькими каплями *кислоты серной* Р до образования суспензии. Тигель накрывают тонкой прозрачной пластиковой пластинкой с висящей каплей *воды Р* и осторожно нагревают; через короткий промежуток времени вокруг капли воды появляется белое кольцо.

СУЛЬФАТЫ

а) Около 45 мг испытуемого образца растворяют в 5 мл *воды Р.* К полученному раствору или к 5 мл раствора, указанного в частной статье, прибавляют 1 мл *кислоты хлористоводородной разведенной* Р и 1 мл *раствора бария хлорида Р1;* образуется белый осадок.

b) К суспензии, полученной в результате реакции (а), прибавляют 0,1 мл *0,05 М раствора йода;* желтая окраска йода не исчезает (отличие от сульфитов и дитионитов), но обесцвечивается при прибавлении по каплям *раствора олова хлорида Р* (отличие от йодатов). Смесь кипятят; осадок не окрашивается (отличие от селенатов и вольфраматов).

СУЛЬФИТЫ

а) К 2 мл раствора, содержащего испытуемый образец в количестве 10-30 мг сульфит-иона (SO_3^{2-}), прибавляют 2 мл *кислоты хлористоводородной разведенной Р* и встряхивают; постепенно выделяется сернистый газ, обнаруживаемый по характерному резкому запаху.

b) К указанному в частной статье раствору, содержащему сульфит-ион (SO_3^{2-}), прибавляют 0,1 мл *0,5 М раствора йода;* реактив обесцвечивается.

СУРЬМА

Около 10 мг испытуемого образца растворяют при нагревании в растворе 0,5 г *калия-натрия тартрата Р* в 10 мл *воды Р* и охлаждают. К 2 мл полученного раствора или к 2 мл раствора, указанного в частной статье, прибавляют по каплям *раствор натрия сульфида Р;* образуется оранжево-красный осадок, растворяющийся при прибавлении *раствора натрия гидроксида разведенного Р.*

ТАРТРАТЫ

а) Около 15 мг испытуемого образца растворяют в 5 мл *воды Р*. К полученному раствору или к 5 мл раствора, указанного в частной статье, прибавляют 0,05 мл раствора 10 г/л *железа (II) сульфата Р* и 0,05 мл *раствора пероксида водорода разведенного Р;* появляется неустойчивое желтое окрашивание. После обесцвечивания раствора к нему прибавляют по каплям *раствор натрия гидроксида разведенный Р;* появляется интенсивное синее окрашивание.

b) К 0,1 мл раствора испытуемого образца около 15 мг/мл кислоты винной, или к 0,1 мл раствора, указанного в частной статье, прибавляют 0,1 мл раствора 100 г/л *калия бромида Р,* 0,1 мл раствора 20 г/л *резорцина Р,* 3 мл *кислоты серной Р* и нагревают на водяной бане от 5 мин до 10 мин; появляется темно-синее окрашивание. Раствор охлаждают и вливают в *воду Р*; окраска раствора изменяется на красную.

ФОСФАТЫ (ОРТОФОСФАТЫ)

а) К 5 мл раствора, указанного в частной статье, при необходимости нейтрализованного, прибавляют 5 мл *раствора серебра нитрата Р1;* образуется желтый осадок, цвет которого не изменяется при кипячении и который растворяется при прибавлении *раствора аммиака Р.*

b) 1 мл раствора, указанного в частной статье, прибавляют 2 мл *молибденованадиевого реактива Р* и перемешивают; появляется желтое окрашивание.

с) # К 1 мл раствора испытуемого образца, содержащего 10-30 мг иона фосфата, в *кислоте азотной разведенной Р*, прибавляют 2 мл *раствора аммония молибдата Р* и нагревают; образуется желтый кристаллический осадок, *растворимый в растворе аммиака разведенного Р1*.

d) # К 1 мл раствора испытуемого образца, содержащего 10-30 мг иона фосфата, прибавляют 1 мл *раствора аммония хлорида Р*, 1 мл *раствора аммиака разведенного Р1* и 0,5 мл раствора 100г/л *магния сульфата Р*; образуется белый кристаллический осадок, растворимый в разведенных минеральных кислотах.

ХЛОРИДЫ

а) Навеску испытуемого образца, содержащую около 2 мг хлорид-иона (Cl^-), растворяют в 2 мл *воды Р.* Полученный раствор или 2 мл раствора, указанного в частной статье, подкисляют *кислотой азотной разведенной Р,* прибавляют 0,4 мл *раствора серебра нитрата Р1,* перемешивают и отстаивают; образуется белый творожистый осадок, который центрифугируют и промывают тремя порциями *воды Р* по 1 мл каждая. Эту операцию проводят быстро в защищенном от яркого света месте, при этом допускается, чтобы жидкость над осадком не была полностью прозрачной. Осадок суспендируют в 2 мл *воды Р* и прибавляют 1,5 мл *раствора аммиака Р;* осадок быстро растворяется; допускается наличие нескольких крупных частиц, растворяющихся медленно.

b) Навеску испытуемого образца, содержащую около 15 мг хлорида (Cl^-), или количество, указанное в частной статье, помещают в пробирку, прибавляют 0,2 г *калия дихромата Р* и 1 мл *кислоты серной Р.* У входного отверстия пробирки помещают фильтровальную бумагу, пропитанную 0,1 мл *раствора дифенилкарбазида Р* (при этом пропитанная бумага не должна соприкасаться с калия дихроматом); бумага окрашивается в фиолетово-красный цвет.

ЦИНК

а) 0,1 г испытуемого образца растворяют в 5 мл *воды Р.* К полученному раствору или к 5 мл раствора, указанного в частной статье, прибавляют 0,2 *мл раствора натрия гидроксида концентрированного Р*; образуется белый осадок. Затем прибавляют еще 2 мл *раствора натрия гидрооксида концентрированного Р;* осадок растворяется. К полученному раствору прибавляют 10 мл *раствора аммония хлорида Р;* раствор остается прозрачным. К раствору прибавляют 0,1 мл *раствора натрия сульфида Р;* образуется белый хлопьевидный осадок.

b) # К 2 мл раствора, содержащего испытуемый образец в количестве 5-20 мг цинк-иона (Zn^{2+}), прибавляют 0,5 мл *раствора калия ферроцианида Р;* образуется белый осадок, нерастворимый в *кислоте хлористоводородной разведенной Р.*

ЦИТРАТЫ

а) Навеску испытуемого образца, содержащую около 50 мг кислоты лимонной, растворяют в 5 мл *воды Р.* К полученному раствору или к 5 мл раствора, указанного в частной статье, прибавляют 0,5 мл *кислоты серной* Р и 1 мл *раствора калия перманганата Р.* Раствор нагревают до обесцвечивания, прибавляют 0,5 мл раствора 100 г/л *натрия нитропруссида Р* в *кислоте серной разведенной Р*, 4 г *кислоты сульфаминовой Р.* К смеси прибавляют *раствор аммиака концентрированный Р* до щелочной реакции среды, прибавляя его по каплям до полного растворения кислоты сульфаминовой. Прибавление избытка *раствора аммиака концентрированного Р* приводит к появлению фиолетового окрашивания, переходящего в фиолетово-синее.

b) # К 1 мл нейтрального раствора, содержащего испытуемый образец в количестве 2-10 мг цитрат-иона, прибавляют 1 мл раствора 200 г/л *кальция хлорида Р*; раствор остаётся прозрачным; при кипячении раствора образуется белый осадок, растворимый в *кислоте хлористоводородной разведенной Р*.

с) # К количеству образца, эквивалентному 1-2 мг цитрат-иона, прибавляют 0,5 мл *ангидрида уксусного Р* и нагревают; через 20-40 с появляется красное окрашивание.

ЭФИРЫ СЛОЖНЫЕ

К 30 мг или к указанному в частной статье количеству испытуемого образца прибавляют 0,5 мл раствора 70 г/л *гидроксиламина гидрохлорида Р* в *метаноле Р,* 0,5 мл раствора 100 г/л *калия гидроксида Р* в *спирте Р,* нагревают при взбалтывании и охлаждают. Полученный раствор подкисляют *кислотой хлористоводородной разведенной Р,* прибавляют 0,2 мл *раствора железа (III) хлорида Р1,* разбавленного в 10 раз; появляется синевато-красное или красное окрашивание.

2.3.2. ИДЕНТИФИКАЦИЯ ЖИРНЫХ МАСЕЛ МЕТОДОМ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Определение проводят методом *тонкослойной хроматографии (2.2.27),* используя в качестве тонкого слоя октадецилсилильный силикагель для высокоэффективной тонкослойной хроматографии.

Испытуемый раствор. Если нет других указаний в частной статье, около 20 мг (каплю) жирного масла растворяют в 3 мл *метиленхлорида Р.*

Раствор сравнения. Около 20 мг (1 каплю) *масла кукурузного Р* растворяют в 3 мл *метиленхлорида Р.*

На линию старта хроматографической пластинки отдельно наносят по 1 мкл испытуемого раствора и раствора сравнения. Пластинку дважды хроматографируют на расстояние 0,5 см, используя в качестве подвижной фазы *эфир Р,* и дважды хроматографируют на расстояние 8 см, используя в качестве подвижной фазы смесь растворителей: *метиленхлорид Р - кислота уксусная ледяная Р - ацетон Р* (20:40:50). Затем пластинку сушат на воздухе, опрыскивают раствором 100 г/л *кислоты фосфорномолибденовой Р* в *спирте Р*, нагревают при температуре 120°С в течение 3 мин и просматривают при дневном освещении.

Типичная хроматограмма для идентификации жирных масел приведена на Рис. 2.3.2.-1.

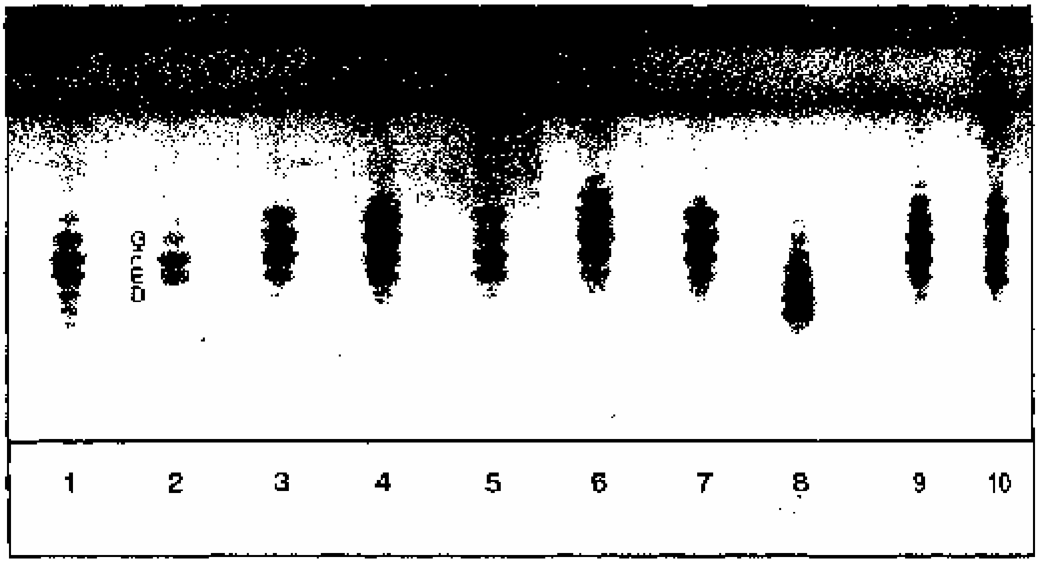


Рис. 2.3.2.-1 — Типичная хроматограмма для идентификации жирных масел

1 - арахисовое масло; 2 - оливковое масло; 3 - кунжутное масло; 4 - кукурузное масло; 5 - миндальное масло; 6 - соевое масло; 7 - подсолнечное масло; 8 - рапсовое масло; 9 - рапсовое масло (*не содержащее эруковой кислоты);* 10 - масло зародышей пшеницы

2.3.3. ИДЕНТИФИКАЦИЯ ФЕНОТИАЗИНОВ МЕТОДОМ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Определение проводят методом *тонкослойной хроматографии (2.2.27),* используя в качестве тонкого слоя *кизельгур G Р.*

Пластинку помещают в закрытую камеру с необходимым количеством пропитывающей смеси, содержащей 10% *(об/об) феноксиэтанола Р* в растворе 50 г/л *полиэтиленгликоля 300 Р* в *ацетоне Р,* таким образом, чтобы она была погружена в пропитывающую смесь примерно на 5 мм. Когда фронт растворителей пройдет 17 см от нижнего края пластинки, ее вынимают из камеры и тотчас используют для хроматографирования. Хроматографирование проводят в том же направлении, что и пропитывание.

Испытуемый раствор. 20 мг испытуемой субстанции растворяют в *хлороформе Р* и доводят до 10 мл тем же растворителем.

Раствор сравнения. 20 мг соответствующего ФСО растворяют в *хлороформе Р* и доводят тем же растворителем до 10 мл.

На линию старта хроматографической пластинки отдельно наносят по 2 мкл испытуемого раствора и раствора сравнения. Пластинку помещают в камеру со смесью *петролейного эфира Р* и *диэтиламина Р* (50:1), насыщенной *феноксиэтанолом Р* (т.е., от 3 мл до 4 мл *феноксиэтанола Р* прибавляют к вышеуказанной смеси растворителей, взбалтывают до образования устойчивой мутности, декантируют и используют верхний слой, который может быть мутным). Хроматографирование проводят в темном месте. Когда фронт растворителей пройдет 15 см от линии старта, пластинку вынимают из камеры, помещают в УФ-свет с длиной волны 365 нм и через несколько минут проводят оценку хроматограммы.

На хроматограмме испытуемого раствора должно обнаруживаться пятно на уровне пятна на хроматограмме раствора сравнения, соответствующее ему по цвету флуоресценции и величине. Затем пластинку опрыскивают раствором 10% (об/об) *кислоты серной Р в спирте Р.* На хроматограмме испытуемого раствора должно обнаруживаться пятно на уровне пятна на хроматограмме раствора сравнения, соответствующее ему по окраске и ее стабильности в течение не менее 20 мин.

2.3.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЗАПАХА

От 0,5 г до 2,0 г испытуемого образца распределяют тонким слоем на часовом стекле диаметром от 6 см до 8 см; через 15 мин определяют запах или делают вывод о его отсутствии.

2.4. ИСПЫТАНИЯ НА ПРЕДЕЛЬНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ПРИМЕСЕЙ

2.4.1. АММОНИЯ СОЛИ

Метод А применяют, если нет других указаний в частной статье.

МЕТОД А

Количество испытуемого образца, указанное в частной статье, помещают в пробирку, растворяют в 14 мл *воды Р,* при необходимости подщелачивают *раствором натрия гидроксида разведенным Р* и доводят объем раствора водой Р до 15 мл. Прибавляют 0,3 мл *раствора калия тетрайодмеркурата щелочного Р.*

В качестве эталона используют раствор, полученный прибавлением к 10 мл *эталонного раствора аммония (1 ppm NH_4) Р* 5 мл *воды Р* и 0,3 мл *раствора калия тетрайодмеркурата щелочного Р.* Пробирки закрывают.

Через 5 мин желтая окраска испытуемого раствора должна быть не интенсивнее окраски эталона.

МЕТОД В

Количество тщательно растертого испытуемого образца, указанное в частной статье, помещают в сосуд вместимостью 25 мл, снабженный полиэтиленовой пробкой, и растворяют или суспендируют в 1 мл *воды Р*. Прибавляют 0,30 г *магния оксида тяжелого Р,* помещают в сосуд под пробку полоску *серебряно-марганцевой бумаги Р,* смоченную несколькими каплями *воды Р*, таким образом, чтобы отрезок бумаги размером 5x5 мм находился ниже нижнего края пробки, после чего сосуд немедленно закрывают пробкой. Перемешивают содержимое сосуда круговыми движениями, не допуская попадания брызг на бумагу, и выдерживают в водяном термостате при температуре 40°С в течение 30 мин.

Параллельно с теми же количествами реактивов и в этих же условиях готовят эталон. К указанному в частной статье количеству *эталонного раствора аммония (1 ppm NH_4) Р* прибавляют 1 мл *воды Р,* 0,30 г *магния оксида тяжелого Р* и далее поступают, как с испытуемым раствором.

Серая окраска *серебряно-марганцевой бумаги Р,* полученная в опыте с испытуемым раствором, должна быть не интенсивнее окраски *серебряно-марганцевой бумаги Р,* полученной в опыте с эталоном.

МЕТОД С

Применяют для образцов, содержащих щелочноземельные и тяжелые металлы.

Количество испытуемого образца, указанное в частной статье, помещают в пробирку, растворяют в минимальном объеме *воды Р*, прибавляют при охлаждении 2 мл *раствора натрия гидроксида разведенного Р* и 2 мл *раствора натрия карбоната Р.* Раствор разводят *водой Р* до указанной в частной статье концентрации, взбалтывают и фильтруют. 10 мл полученного фильтрата помещают в пробирку, доводят объем раствора *водой Р* до 15 мл и прибавляют 0,3 мл *раствора калия тетрайодмеркурата щелочного Р.*

В качестве эталона используют смесь 10 мл *эталонного раствора аммония (I ppm NH_4) Р,* 5 мл *воды Р* и 0,3 мл *раствора калия тетрайодмеркурата щелочного Р.* Пробирки закрывают.

Через 5 мин желтая окраска испытуемого раствора должна быть не интенсивнее окраски эталона.

МЕТОД D

Применяют для образцов, содержащих более 300 ppm примеси железа.

Количество испытуемого образца, указанное в частной статье, помещают в пробирку, растворяют в 10 мл *воды Р*, прибавляют 2 капли *раствора натрия гидрооксида разведенного* Р и 3 мл раствора 200 г/л *калия-натрия тартрата Р.* Тщательно перемешивают, доводят объем раствора *водой Р* до 15 мл и прибавляют 0,3 мл *раствора калия тетрайодмеркурата щелочного* Р. Пробирку закрывают.

Параллельно с теми же количествами реактивов и в тех же условиях готовят эталон, используя вместо 10 мл испытуемого раствора 10 мл *эталонного раствора аммония (1 ppm* NH_4*) Р.*

Через 5 мин желтая окраска испытуемого раствора должна быть не интенсивнее окраски эталона.

2.4.2. МЫШЬЯК

МЕТОД А

Прибор (см. Рис. 2.4.2.-1) состоит из конической колбы вместимостью 100 мл, закрытой стеклянной притертой пробкой, через которую проходит стеклянная трубка длиной около 200 мм, с внутренним диаметром 5 мм. Нижняя часть трубки вытянута до внутреннего диаметра 1,0 мм; на расстоянии 15 мм от кончика трубки расположено боковое отверстие диаметром от 2 мм до 3 мм. Трубка помещена таким образом, чтобы боковое отверстие находилось минимум на 3 мм ниже нижней поверхности пробки. Верхний конец трубки должен иметь совершенно плоскую притертую поверхность, расположенную под прямым углом к оси трубки. Другая стеклянная трубка длиной 30 мм с таким же внутренним диаметром и такой же плоской притертой поверхностью помещается сверху первой и плотно прикрепляется к ней двумя пружинами.

Нижнюю трубку неплотно заполняют 50-60 мг *свинцово-ацетатной ваты Р* или помещают небольшой ватный тампон и скрученную в трубочку полоску *свинцово-ацетатной бумаги Р,* массой 50-60 мг. Между плоскими поверхностями трубок помещают кусочек *ртутно-бромидной бумаги Р* такого размера, чтобы закрыть отверстие трубки (15x15) мм.

Указанное количество испытуемого образца помещают в коническую колбу и растворяют в 25 мл *воды Р* или указанный объем испытуемого раствора помещают в коническую колбу; доводят объем раствора *водой Р* до 25мл. Прибавляют 15мл *кислоты хлористоводородной Р,* 0,1 мл *раствора олова (II) хлорида Р, 5* мл *раствора калия йдида Р,* оставляют на 15 мин и затем прибавляют 5 г *цинка активированного Р.* Немедленно соединяют две части прибора, колбу помещают в водяную баню, температура которой поддерживается такой, чтобы обеспечить равномерное выделение газа (# температура водяной бани не должна превышать 40^{o}C).

Параллельно с теми же количествами реактивов и в этих же условиях проводят опыт с эталоном, состоящим из 1 мл *эталонного раствора мышьяка (1 ppm As) Р* и 24 мл *воды Р*.

По истечении не менее 2 ч окраска ртутно-бромидной бумаги, полученная в опыте с испытуемым раствором, должна быть не интенсивнее окраски ртутно-бромидной бумаги, полученной в опыте с эталоном.

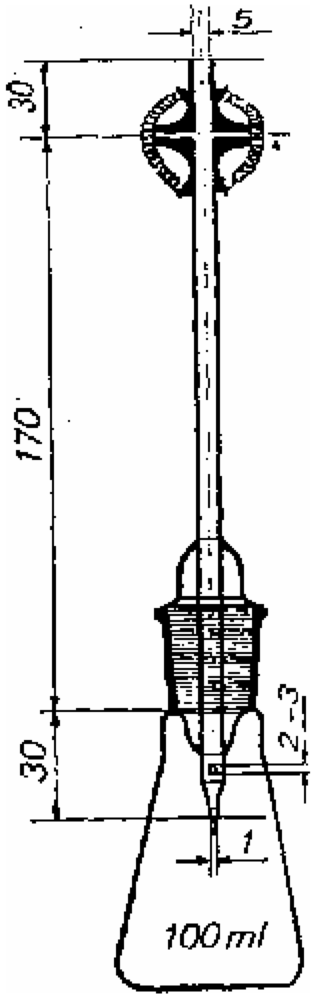


Рис. 2.4.2.-1. Прибор для испытания на мышьяк (метод А)
Размеры указаны в миллиметрах

МЕТОД В

Количество испытуемого образца, указанное в частной статье, помещают в пробирку, содержащую 4 мл *кислоты хлористоводородной Р* и около 5 мг *калия йодида Р,* и прибавляют 3 мл *реактива гипофосфита Р.* Смесь нагревают на водяной бане в течение 15 мин, время от времени встряхивая.

Параллельно с теми же количествами реактивов и в этих же условиях готовят эталон, используя вместо испытуемого вещества 0,5 мл *эталонного раствора мышьяка (10 ppm As) Р.*

После нагревания на водяной бане окраска испытуемого раствора должна быть не интенсивнее окраски эталона.

Метод В применяют в случае определения наряду с мышьяком селена и теллура, а также при определении мышьяка в образцах, содержащих сурьму, висмут, ртуть и серебро, а также сульфиды и сульфиты, и в других случаях, указанных в частных статьях.

2.4.3. КАЛЬЦИЙ

При приготовлении всех растворов, применяемых в данном испытании, должна использоваться вода дистиллированная Р.

К 0,2 мл *эталонного раствора кальция спиртового (100 ppm Са) Р* прибавляют 1 мл *раствора аммония оксалата Р.* Через 1 мин прибавляют смесь 1 мл *кислоты уксусной разведенной Р* и 15 мл раствора, содержащего указанное в частной статье количество испытуемого образца, и встряхивают.

Параллельно с теми же количествами реактивов и в этих же условиях готовят эталон, используя смесь 1 мл *кислоты уксусной разведенной Р,* 10 мл *эталонного раствора кальция водного (10 ppm Са) Р* и 5 мл *воды дистиллированной Р.*

Через 15 мин опалесценция испытуемого раствора не должна превышать опалесценцию эталона.

2.4.4. ХЛОРИДЫ

К 15 мл раствора, указанного в частной статье, прибавляют 1 мл *кислоты азотной разведенной Р* и выливают смесь в один прием в пробирку, содержащую 1 мл *раствора серебра нитрата Р2.*

Параллельно с теми же количествами реактивов и в этих же условиях готовят эталон, используя вместо 15 мл испытуемого раствора 10 мл *эталонного раствора хлорида (5 ppm Cl) Р* и 5 мл *воды Р.* Пробирки помещают в защищенное от света место.

Через 5 мин пробирки просматривают на черном фоне горизонтально (перпендикулярно оси пробирок). Опалесценция испытуемого раствора не должна превышать опалесценцию эталона.

2.4.5. ФТОРИДЫ

Количество испытуемого образца, указанное в частной статье, 0,1 г *песка Р,* промытого кислотой, и 20 мл смеси равных объемов *кислоты серной Р* и *воды Р* помещают во внутреннюю пробирку прибора, изображенного на Рис. 2.4.5.-1. Рубашку, заполненную *тетрахлорэтаном Р,* нагревают до температуры кипения тетрахлорэтана (146°С). Подсоединяют генератор водяного пара и отгоняют содержимое пробирки с перегретым водяным паром, собирая отгон в мерную колбу вместимостью 100 мл, содержащую 0,3 мл *0,1 М раствора натрия гидроксида* и 0,1 мл *раствора фенолфталеина Р.* Объем раствора в пробирке во время отгонки должен быть постоянным (20 мл). Поддерживают щелочную реакцию содержимого мерной колбы, при необходимости прибавляя по каплям *0,1 М раствор натрия гидроксида.* Доводят объем раствора *водой Р* до метки и перемешивают (испытуемый раствор).

Параллельно с теми же количествами реактивов и в этих же условиях готовят эталон, используя вместо испытуемого вещества 5 мл *эталонного раствора фторида (10 ppm F) Р.*

В цилиндр со стеклянной притертой пробкой помещают 20 мл испытуемого раствора, в другой такой же цилиндр - 20 мл эталона, затем в каждый цилиндр прибавляют по 5 мл *реактива аминометилализариндиуксусной кислоты Р.*

Через 20 мин синяя окраска испытуемого раствора, появившаяся вместо первоначальной красной, должна быть не интенсивнее окраски эталона.

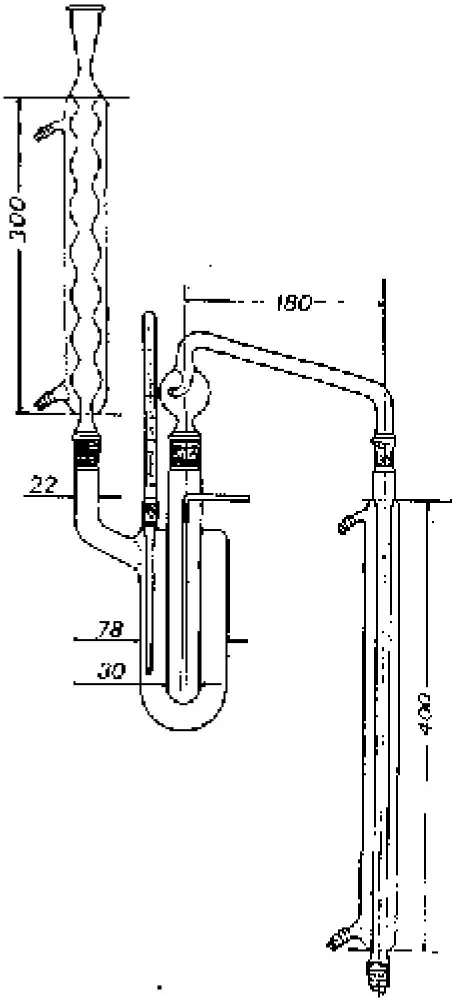


Рисунок 2.4.5.-1. Прибор для испытания на фториды
Размеры указаны в миллиметрах

2.4.6. МАГНИЙ

К 10 мл раствора испытуемого образца, приготовленного, как указано в частной статье, прибавляют 0,1 г *динатрия тетрабората Р.* Определяют pH раствора и при необходимости доводят до pH 8,8-9,2, используя *кислоту хлористоводородную разведенную Р* или *раствор натрия гидроксида разведенный Р.* Раствор помещают в делительную воронку, встряхивают в течение 1 мин с двумя порциями, по 5 мл каждая, раствора 1 г/л *гидроксихинолина Р* в *хлороформе Р,* оставляют до расслоения и отбрасывают органический слой. К водному слою прибавляют 0,4 мл *бутиламина Р* и 0,1 мл *триэтаноламина Р.* Определяют pH раствора и при необходимости доводят до pH 10,5-11,5. Прибавляют 4 мл раствора 1 г/л *гидроксихинолина Р в хлороформе Р*, встряхивают в течении 1 мин, оставляют до расслоения, нижний слой отбирают и используют для испытания.

Параллельно с теми же количествами реактивов и в этих же условиях готовят эталон, используя вместо 10 мл раствора испытуемого вещества смесь 1 мл *эталонного раствора магния (10 ppm Mg) Р* и 9 мл *воды Р.*

Окраска испытуемого раствора должна быть не интенсивнее окраски эталона.

2.4.7. МАГНИЙ И ЩЕЛОЧНОЗЕМЕЛЬНЫЕ МЕТАЛЛЫ

К 200 мл *воды Р* прибавляют 0,1 г *гидроксиламина гидрохлорида Р,* 10 мл *амиачного буферного раствора рН 10,0 Р,* 1 мл *0,1 М раствора цинка сульфата и* около 15 мг *индикаторной смеси протравного черного 11 Р.* Нагревают до температуры около 40°С. Полученный раствор титруют *0,01 М раствором натрия эдетата* до перехода окраски раствора от фиолетовой к синей. К полученному раствору прибавляют указанное в частной статье количество испытуемого вещества, растворенное в 100 мл *воды Р,* или используют указанный в частной статье раствор. Если окраска раствора становится фиолетовой, снова титруют до перехода окраски раствора к синей.

Объем *0,01 М раствора натрия эдетата,* израсходованный на второе титрование, не должен превышать объем титранта, указанный в частной статье.

2.4.8. ТЯЖЕЛЫЕ МЕТАЛЛЫ

МЕТОД А

К 12 мл водного раствора, указанного в частной статье, прибавляют 2 мл *буферного раствора рН 3,5 Р* и перемешивают. Полученную смесь прибавляют к 1,2 мл *тиоацетамидного реактива Р* и немедленно перемешивают.

Параллельно с теми же количествами реактивов и в этих же условиях готовят эталон, используя вместо 12 мл испытуемого раствора смесь 10 мл *эталонного раствора свинца (1 ppm или 2 ppm Pb) Р,* указанного в частной статье, и 2 мл испытуемого раствора.

Готовят контрольный раствор, используя смесь 10 мл *воды Р* и 2 мл испытуемого раствора. В сравнении с контрольным раствором эталон должен иметь светло-коричневую окраску.

Через 2 мин коричневая окраска испытуемого раствора должна быть не интенсивнее окраски эталона.

МЕТОД В

Испытуемый образец растворяют в органическом растворителе с минимально необходимым количеством воды (например, диоксан или ацетон с добавлением 15% воды).

К 12 мл раствора, указанного в частной статье, прибавляют 2 мл *буферного раствора рН 3,5 Р* и перемешивают. Полученную смесь прибавляют к 1,2 мл *тиоацетамидного реактива Р* и немедленно перемешивают.

Параллельно с теми же количествами реактивов и в этих же условиях готовят эталон, используя вместо 12 мл испытуемого раствора смесь 10 мл *эталонного раствора свинца (1 ppm или 2 ppm Pb), как* указано в частной статье, и 2 мл испытуемого раствора. *Эталонный раствор свинца (1 ppm или 2 ppm Pb)* готовят путем разведения *эталонного раствора свинца (100 ppm Pb) Р* растворителем, применяемым для растворения испытуемого вещества.

Готовят контрольный раствор, используя смесь 10 мл растворителя, применяемого для растворения испытуемого вещества, и 2 мл испытуемого раствора. В сравнении с контрольным раствором эталон должен иметь светло-коричневую окраску.

Через 2 мин коричневая окраска испытуемого раствора должна быть не интенсивнее окраски эталона.

МЕТОД C

В фарфоровый или кварцевый тигель помещают 4 мл раствора 250 г/л *магния сульфата Р* в *кислоте серной разведенной Р* и прибавляют количество испытуемого образца, указанное в частной статье (не более 2 г). Перемешивают тонкой стеклянной палочкой и осторожно нагревают. Если смесь жидкая, осторожно выпаривают на водяной бане до сухого остатка, затем постепенно нагревают до обугливания и продолжают нагревание до получения почти белого или в крайнем случае, сероватого остатка. Сжигание проводят при температуре не более 800^{o}С. Оставляют до охлаждения, затем остаток в тигле смачивают несколькими каплями *кислоты серной разведенной Р.* Выпаривают до сухого остатка, вновь сжигают и оставляют до охлаждения. Общее время сжигания не должно превышать 2 ч. Остаток из тигля количественно переносят в пробирку двумя порциями *кислоты хлористоводородной разведенной Р,* по 5 мл каждая. Прибавляют 0,1 мл *раствора фенолфталеина Р*, затем нейтрализуют *раствором аммиака концентрированным Р* до появления розовой окраски. Охлаждают, прибавляют *кислоту уксусную ледяную Р* до обесцвечивания раствора и прибавляют еще 0,5 мл *кислоты уксусной ледяной Р.* При необходимости фильтруют и промывают фильтр *водой Р.* Доводят объем раствора *водой* Р до 20 мл и перемешивают. 12 мл полученного раствора помещают в пробирку, прибавляют 2 мл *буферного раствора pH 3,5 Р* и перемешивают. Полученную смесь прибавляют к 1,2 мл *тиоацетамидного реактива Р* и немедленно перемешивают.

Параллельно готовят эталон, используя 4 мл раствора 250 г/л *магния сульфата Р* в *кислоте серной разведенной Р* и указанный объем *эталонного раствора свинца (10 ppm Pb) Р.* Сжигают в тех же условиях, что и испытуемое вещество, количественно переносят кислотой хлористоводородной, прибавляют раствор аммиака и затем кислоту уксусную. Доводят объем раствора до 20 мл *водой Р* и перемешивают. К 10 мл полученного раствора прибавляют 2 мл раствора, полученного при обработке испытуемого вещества, и 2 мл *буферного раствора pH 3,5 Р* и перемешивают. Полученную смесь прибавляют к 1.2 мл *тиоацетамидного реактива Р* и немедленно перемешивают.

Готовят контрольный раствор, используя смесь 10 мл *воды* Р и 2 мл раствора, полученного при обработке испытуемого вещества. В сравнении с контрольным раствором эталон должен иметь светло-коричневую окраску.

Через 2 мин коричневая окраска испытуемого раствора должна быть не интенсивнее окраски эталона.

МЕТОД D

Количество испытуемого образца, указанное в частной статье, помещают в фарфоровый или кварцевый тигель и тщательно смешивают с 0,5 г *магния оксида Р1.* Сжигают при слабом красном калении (около 600°C) до образования однородного остатка белого или серовато-белого цвета. Если после 30 мин сжигания смесь остается окрашенной, тигель оставляют до охлаждения, содержимое перемешивают тонкой стеклянной палочкой и повторяют сжигание. При необходимости операцию повторяют. Нагревают при температуре 800°C около 1 ч. Остаток из тигля количественно переносят в пробирку двумя порциями по 5 мл смеси равных объемов *раствора кислоты хлористоводородной Р1* и *воды Р.* Прибавляют 0,1мл *раствора фенолфталеина Р,* затем подщелачивают *раствором аммиака концентрированным Р* до появления розовой окраски. Охлаждают,

подкисляют *кислотой уксусной ледяной Р* до обесцвечивания раствора и прибавляют еще 0,5 мл *кислоты уксусной ледяной Р.* При необходимости фильтруют и промывают фильтр *водой Р.* Доводят объем раствора *водой Р* до 20 мл и перемешивают. 12 мл полученного раствора помещают в пробирку, прибавляют 2 мл *буферного раствора pH 3,5 Р* и перемешивают. Полученную смесь прибавляют к 1,2 мл *реактива тиоацетамида Р* и немедленно перемешивают.

Параллельно готовят эталон следующим образом. К 0,5 г *магния оксида Р1* прибавляют указанный в частной статье объем *эталонного раствора свинца (10 ppm Pb) Р.* Высушивают в сушильном шкафу при температуре от 100°С до 105°С, затем сжигают в тех же условиях, что и испытуемое вещество, количественно переносят кислотой хлористоводородной, прибавляют раствор аммиака и затем кислоту уксусную. Доводят объем раствора до 20 мл *водой Р* и перемешивают. К 10 мл полученного раствора прибавляют 2 мл раствора, полученного при обработке испытуемого вещества, и 2 мл *буферного раствора pH 3,5 Р* и перемешивают. Полученную смесь прибавляют к 1,2 мл *реактива тиоацетамида Р* и немедленно перемешивают.

Готовят контрольный раствор, используя смесь 10 мл *воды Р* и 2 мл испытуемого раствора. В сравнении с контрольным раствором эталон должен иметь светло-коричневую окраску.

Через 2 мин коричневая окраска испытуемого раствора должна быть не интенсивнее окраски эталона.

МЕТОД E

Количество испытуемого образца, указанное в частной статье, растворяют в 30 мл или в указанном объеме *воды Р.*

В держатель устройства для стерильного фильтрования, на подложку которого помещен мембранный фильтр (размер пор 3 мкм), а сверху него - предфильтр (Рис. 2.4.8.-1), устанавливают шприц вместимостью 50 мл без поршня.

Испытуемый раствор помещают в шприц и вводят поршень, развивая такое давление, чтобы профильтровался весь раствор. Открывают держатель и вынимают предфильтр таким образом, чтобы мембранный фильтр не загрязнился примесями. В противном случае его заменяют другим мембранным фильтром и операцию повторяют в тех же условиях.

К фильтрату или к указанному в частной статье объему фильтрата прибавляют 2 мл *буферного раствора pH 3,5 Р* и перемешивают. Полученную смесь прибавляют к 1,2 мл *реактива тиоацетамида Р* и перемешивают, оставляют на 10 мин и вновь фильтруют, как описано выше, но расположение фильтров изменяют таким образом, чтобы жидкость проходила вначале через мембранный фильтр, а затем - через предфильтр (Рис. 2.4.8.-1). Давление поршня шприца должно быть умеренным и постоянным для обеспечения медленного и равномерного фильтрования. После окончания фильтрования держатель открывают, мембранный фильтр вынимают и высушивают при помощи фильтровальной бумаги.

Эталон готовят аналогично, используя указанный в частной статье объем *эталонного раствора свинца (1 ppm Pb) Р.*

Окраска мембранного фильтра, полученная в опыте с испытуемым раствором, должна быть не интенсивнее окраски мембранного фильтра, полученной в опыте с эталоном.

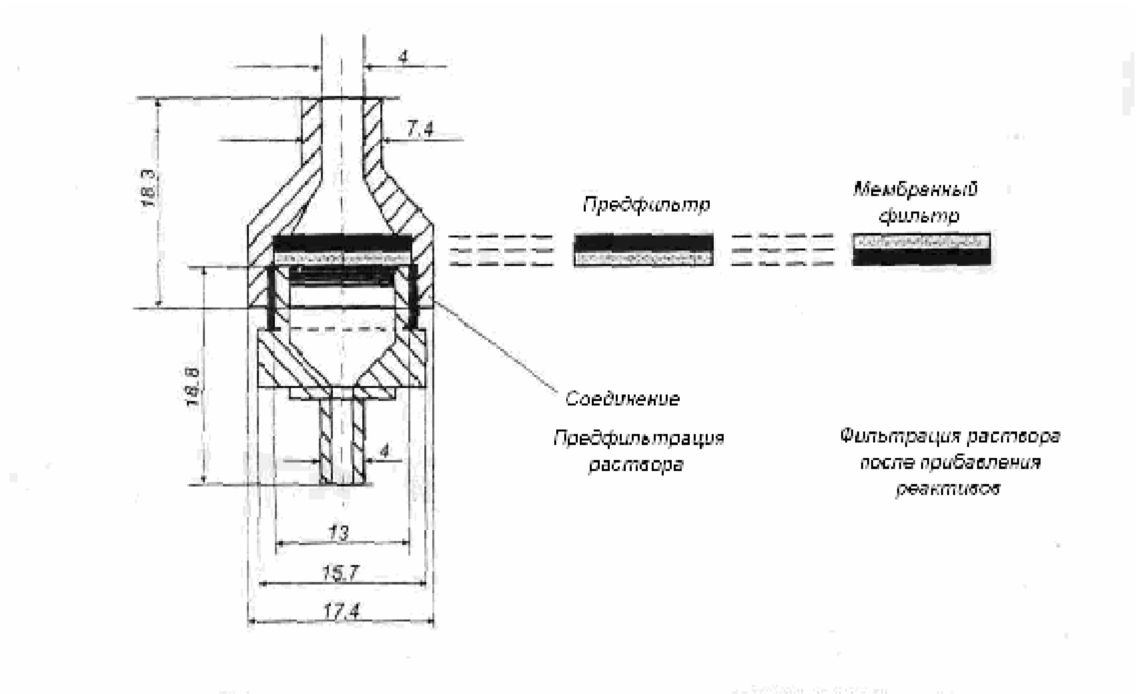


Рисунок 2.4.8.-1. Прибор для испытания на соли тяжелых металлов (метод E)
Размеры указаны в миллиметрах

МЕТОД F

Количество испытуемого образца, указанное в частной статье, помещают в чистую, сухую колбу Кьельдаля вместимостью 100 мл (в случае интенсивного пенообразования следует применить колбу вместимостью 300 мл). Колбу закрепляют под углом 45° и прибавляют смесь 8 мл *кислоты серной Р* и 10 мл *кислоты азотной Р* в количестве, достаточном для полного смачивания испытуемого вещества. Осторожно нагревают до начала реакции. После прекращения реакции прибавляют дополнительные порции этой же смеси кислот, нагревая после каждого прибавления. Операцию повторяют до тех пор, пока объем прибавленной смеси кислот не достигнет 18 мл. Усиливают нагрев и осторожно кипятят до потемнения раствора. Охлаждают, прибавляют 2 мл *кислоты азотной Р* и вновь нагревают до потемнения раствора. Продолжают прибавление *кислоты азотной Р* с последующим нагреванием до тех пор, пока раствор не перестанет темнеть, затем сильно нагревают до появления плотных белых паров. Охлаждают, осторожно прибавляют 5 мл *воды Р*, кипятят с предосторожностями до появления плотных белых паров и продолжают нагревание до получения остатка объемом от 2 мл до 3 мл. Охлаждают, осторожно прибавляют 5 мл *воды Р* и определяют окраску раствора. Если раствор имеет желтую окраску, прибавляют по каплям 1 мл *раствора водорода пероксида концентрированного Р* и вновь нагревают до появления плотных белых паров и продолжают нагревание до получения остатка объёмом от 2 мл до 3 мл. Если окраска раствора всё ещё остаётся жёлтой, повторяют прибавление 5 мл *воды Р* и 1 мл *раствора водорода пероксида концентрированного Р* до обесцвечивания раствора. Охлаждают, осторожно доводят объём раствора *водой Р* до 25 мл.

Доводят pH раствора до 3,0-4,0 *раствором аммиака концентрированным Р1* (при приближении к указанному значению pH можно применять *раствор*

аммиака разведенный Р1), используя в качестве внешнего индикатора индикаторную бумагу, действующую в узком интервале pH, затем доводят объем раствора *водой Р* до 40 мл, перемешивают и прибавляют 2 мл *буферного раствора pH 3,5 Р.* Полученную смесь прибавляют к 1,2 мл *тиоацетамидного реактива Р* и немедленно перемешивают. Доводят объем раствора *водой Р* до 50 мл и перемешивают.

Параллельно с теми же количествами реактивов и в этих же условиях готовят эталон, используя вместо испытуемого вещества указанный в частной статье объем *эталонного раствора свинца (10 ppm Pb) Р.*

Через 2 мин коричневая окраска испытуемого раствора должна быть не интенсивнее окраски эталона.

2.4.9. ЖЕЛЕЗО

Количество испытуемого образца, указанное в частной статье, растворяют в *воде Р*, доводят объём раствора *водой Р* до 10 мл и перемешивают; или используют 10 мл раствора, указанного в частной статье. Прибавляют 2 мл раствора 200 г/л *кислоты лимонной Р* и 0,1 мл *кислоты тиогликолевой Р*. Перемешивают, подщелачивают *раствором аммиака Р*, доводят объём раствора *водой Р* до 20 мл.

Параллельно с теми же количествами реактивов и в этих же условиях готовят эталон, используя 10 мл *эталонного раствора железа (III) (1 ppm Fe) Р*.

Через 5 мин розовая окраска испытуемого раствора должна быть не интенсивнее окраски эталона.

2.4.10. СВИНЕЦ В САХАРАХ

Определение свинца проводят *методом атомно-абсорбционной спектрометрии* (2.2.23, метод 2).

Испытуемый раствор. 20,0 г испытуемого вещества растворяют в смеси равных объёмов *кислоты уксусной разведенной Р* и *воды Р*, доводят объём раствора этой же смесью растворителей до 100 мл и перемешивают. Прибавляют 2,0 мл насыщенного раствора (около 10 г/л) *аммония пирролидиндитиокарбамата Р* и 10.0 мл *метилизобутилкетона Р* и встряхивают в течение 30 с в защищённом от яркого света месте. Оставляют до расслоения. Для испытания используют слой метилизобутилкетона.

Растворы сравнения. Готовят три раствора сравнения аналогично испытуемому раствору, но с добавлением к 20,0 г испытуемого вещества соответственно 0,5 мл, 1,0 мл и 1,5 мл *эталонного раствора свинца (10 ppm Pb) Р.*

Устанавливают нулевую точку на приборе, используя *метилизобутилкетон Р*, обработанный аналогично испытуемому раствору, но без добавления испытуемого вещества. Измеряют поглощение при длине волны 283,3 нм, используя в качестве источника излучения лампу с полым свинцовым катодом и воздушно-ацетиленовое пламя.

Испытуемоый образец должен содержать не более 0,5 ppm свинца, если нет других указаний в частной статье.

2.4.11. ФОСФАТЫ

К 100 мл приготовленного и при необходимости нейтрализованного, как указано в частной статье, раствора прибавляют 4 мл *сульфомолибденового реактива Р3*. Встряхивают и прибавляют 0,1 мл *раствора олова (II) хлорида Р1.*

Параллельно с теми же количествами реактивов и в этих же условиях готовят эталон, используя вместо 100 мл раствора испытуемого вещества смесь 2 мл *эталонного раствора фосфата (5 ppm PO_4) Р* и 98 мл *воды Р*. Через 10 мин сравнивают окраску 20 мл каждого раствора.

Окраска испытуемого раствора должна быть не интенсивнее окраски эталона.

2.4.12. КАЛИЙ

К 10 мл раствора, приготовленного, как указано в частной статье, прибавляют 2 мл свежеприготовленного раствора 10 г/л *натрия тетрафенилбората Р.*

Параллельно с теми же количествами реактивов и в этих же условиях готовят эталон, используя вместо 10 мл раствора испытуемого образца смесь 5 мл *эталонного раствора калия (20 ppm K) Р* и 5 мл *воды Р.*

Через 5 мин опалесценция испытуемого раствора не должна превышать опалесценцию эталона.

2.4.13. СУЛЬФАТЫ

При приготовлении всех растворов, применяемых в данном испытании, должна использоваться вода дистиллированная Р.

К 1,5 мл *эталонного раствора сульфата (10 ppm SO_4) Р1* прибавляют 1 мл раствора 250 г/л *бария хлорида Р*. Встряхивают и оставляют на 1 мин, затем прибавляют 15 мл испытуемого раствора, приготовленного как указано в частной статье, и 0,5 мл *кислоты уксусной Р.*

Параллельно с теми же количествами реактивов и в этих же условиях готовят эталон, используя вместо испытуемого раствора 15 мл *эталонного раствора сульфата (10 ppm SO_4) Р.*

Через 5 мин опалесценция испытуемого раствора не должна превышать опалесценцию эталона.

2.4.14. СУЛЬФАТНАЯ ЗОЛА

МЕТОД А

Около 1 г (точная навеска) или указанное в частной статье количество испытуемого образца помещают в предварительно прокаленный и взвешенный фарфоровый, кварцевый или платиновый тигель, смачивают 1 мл *кислоты серной Р,* осторожно нагревают на пламени или на песчаной бане до удаления паров кислоты серной и прокаливают при температуре $(600 \pm 25)^{\circ}C$ до исчезновения темных частиц. По окончании сжигания тигель охлаждают в эксикаторе, взвешивают и вычисляют содержание зольного остатка в испытуемом веществе. Если содержание золы превышает предел, указанный в частной статье, остаток вновь смачивают 1 мл *кислоты серной* Р, нагревают и сжигают, как описано выше, и вновь вычисляют содержание золы. Продолжают сжигание до постоянной массы, если нет других указаний в частной статье.

МЕТОД В

Фарфоровый, кварцевый или платиновый тигель нагревают при красном калении (около $500^{\circ}C$)в течении 30 мин, охлаждают в эксикаторе и взвешивают. Испытуемый образец помещают в тигель и прибавляют 2 мл *кислоты серной*

разведённой Р, нагревают сначала на водяной бане, затем осторожно на пламени. Затем температуру постепенно увеличивают до 600°С и продолжают сжигание до исчезновения темных частиц. Тигель оставляют до охлаждения, прибавляют несколько капель кислоты *серной разведенной Р,* нагревают и сжигают, как описано выше, затем вновь охлаждают. Прибавляют несколько капель *раствора аммония карбоната Р.* Выпаривают и осторожно сжигают, охлаждают в эксикаторе, взвешивают и повторяют сжигание по 15 мин до постоянной массы.

#МЕТОД С

Около 1 г (точная навеска) или указанное в частной статье количество испытуемого образца помещают в предварительно прокаленный и взвешенный фарфоровый, кварцевый или платиновый тигель. Осторожно нагревают на пламени или на песчаной бане до полного обугливания вещества, охлаждают и, если нет других указаний в частной статье, смачивают остаток 1 мл *кислоты серной Р,* осторожно нагревают до удаления паров кислоты серной и сжигают при температуре (800$\pm$25)^{o}С до исчезновения темных частиц. По окончании сжигания тигель охлаждают в эксикаторе, взвешивают и вычисляют содержание зольного остатка в испытуемом веществе. Если содержание золы превышает предел, указанный в частной статье, остаток вновь смачивают 1 мл *кислоты серной Р,* нагревают и сжигают, как описанно выше, и вновь вычисляют содержание золы. Продолжают сжигание до постоянной массы, если нет других указаний в частной статье.

2.4.15. НИКЕЛЬ В ПОЛИОЛАХ

Определение никеля проводят методом *атомно-абсорбционной спектрометрии (2.2.23,* метод 2*).*

Испытуемый раствор. 20,0 г испытуемого образца растворяют в смеси равных объемов кислоты *уксусной разведенной Р* и воды *Р,* доводят объем раствора этой же смесью растворителей до 100 мл и перемешивают. Прибавляют 2,0 мл насыщенного раствора (около 10 г/л) *аммония пирролидиндитиокарбамата* Р и 10,0 мл *метилизобутилкетона Р* и встряхивают в течение 30 с в защищенном от яркого света месте. Оставляют до расслоения. Для испытания используют слой метилизобутилкетона.

Растворы сравнения. Готовят три раствора сравнения аналогично испытуемому раствору, но с добавлением к 20,0 г испытуемого вещества соответственно 0,5 мл, 1,0 мл и 1,5 мл *эталонного раствора никеля (10 ppm Ni) Р.*

Устанавливают нулевую точку на приборе, используя *метилизобутилкетон Р,* обработанный аналогично испытуемому раствору, но без добавления испытуемого вещества. Измеряют поглощение при длине волны 232,0 нм, используя в качестве источника излучения лампу с полым никелевым катодом и воздушно-ацетиленовое пламя.

Испытуемый образец должно содержать не более 1 ppm никеля, если нет других указаний в частной статье.

2.4.1.6. ОБЩАЯ ЗОЛА

Фарфоровый, кварцевый или платиновый тигель нагревают при красном калении (около 500^{o}С) в течение 30 мин, охлаждают в эксикаторе и

взвешивают. Если нет других указаний в частной статье, 1,00 г испытуемого вещества или измельченного в порошок лекарственного растительного сырья помещают в тигель и равномерно распределяют по дну тигля. Высушивают при температуре от 100°С до 105°С в течение 1 ч и затем сжигают до постоянной массы в муфельной печи при температуре (600±25)°С, охлаждая тигель в эксикаторе после каждого сжигания. В продолжение всей процедуры в тигле не должно появляться пламя. Если после длительного сжигания зола всё ещё содержит тёмные частицы, содержимое тигля количественно переносят горячей водой на беззольный фильтр и сжигают остаток на фильтре вместе с фильтровальной бумагой. Фильтрат объединяют с золой, осторожно выпаривают до сухого остатка и сжигают до постоянной массы.

2.4.17. АЛЮМИНИЙ

Раствор испытуемого образца, приготовленный, как указано в частной статье, помещают в делительную воронку, встряхивают с двумя порциями, по 20 мл каждая, раствора 5 г/л *гидроксихинолина Р* в *хлороформе Р,* затем с 10мл этого же раствора. Хлороформные слои отделяют и собирают в мерную колбу вместимостью 50,0 мл. Доводят объем раствора *хлороформом Р* до метки и перемешивают (испытуемый раствор).

Эталон готовят аналогично, используя указанный в частной статье раствор сравнения.

Контрольный раствор готовят аналогично, используя указанный в частной статье раствор.

Измеряют интенсивность флуоресценции *(2.2.21)* испытуемого раствора (I_1), эталона (I_2) и холостого раствора (I_3), используя возбуждающее излучение при длине волны 392 нм и вторичный фильтр с полосой пропускания, имеющей максимум при длине волны 518 нм, или монохроматор, установленный на пропускание этой длины волны.

Флуоресценция $(I_1$-$I_3)$ испытуемого раствора не должна превышать флуоресценцию эталона $(I_2$-$I_3)$.

2.4.18. СВОБОДНЫЙ ФОРМАЛЬДЕГИД

Метод А применяют, если нет других указаний в частной статье. Метод В применяют для вакцин, в которых для нейтрализации избыточного формальдегида используют натрия метабисульфит.

МЕТОД А

Вакцины, используемые в медицине, разводят в 10 раз.

1 мл испытуемой вакцины, разведенной, как указано выше, помещают в пробирку и прибавляют 4 мл *воды Р* и 5 мл *реактива ацетилацетона Р1.* Пробирку помещают в водяную баню с температурой 40°С на 40 мин.

Параллельно в этих же условиях готовят эталон, используя вместо разведенной вакцины 1 мл *раствора формальдегида Р,* разведенного до содержания формальдегида (CH_2O) 20 мкг/мл.

Пробирки просматривают вдоль их вертикальных осей. Окраска испытуемого раствора должна быть не интенсивнее окраски эталона.

МЕТОД В

В пробирку помещают 0,5 мл испытуемой вакцины, разведенной в соотношении 1 к 100, прибавляют 5 мл раствора 0,5 г/л *метилбензотиазолонгидразона гидрохлорида Р* и 0,05 мл *полисорбата 80*

Р, пробирку закрывают, встряхивают и оставляют на 60 мин. Затем прибавляют 1 мл *реактива железа (III) хлорида и сульфаминовой кислоты Р* и оставляют на 15 мин.

Параллельно с теми же количествами реактивов и в этих же условиях готовят эталон, используя вместо 0,5 мл разведенной испытуемой вакцины 0,5 мл *раствора формальдегида Р,* разведенного до содержания формальдегида (CH_2O) 5 мкг/мл.

Измеряют *оптическую плотность (2.2.25)* полученных растворов на спектрофотометре при длине волны 628 нм, используя в качестве компенсационного раствора контрольный раствор.

Оптическая плотность испытуемого раствора не должна превышать оптическую плотность эталона.

Если испытуемая вакцина представляет собой эмульсию, водную фазу отделяют следующим способом. К вакцине прибавляют равный объем *изопропилмиристата Р* и перемешивают. К трем объемам полученной смеси прибавляют два объема *1 М раствора кислоты хлористоводородной,* три объема *хлороформа Р* и четыре объема раствора 9 г/л *натрия хлорида Р.* Тщательно перемешивают и центрифугируют с ускорением 15000 g в течение 60 мин. Водный слой отбирают и измеряют его объем. Водный слой используют для испытания на формальдегид, как указано выше.

Вычисляют концентрацию формальдегида в эталоне с учетом разведения вакцины в процессе разделения слоев и готовят эталон с соответствующей концентрацией.

Если описанная процедура не позволяет достичь разделения слоев, прибавляют раствор 100 г/л *полисорбата 20 Р* в растворе 9 г/л *натрия хлорида Р* и повторяют процедуру, центрифугируя с ускорением 22500 g.

2.4.19. ЩЕЛОЧНЫЕ ПРИМЕСИ В ЖИРНЫХ МАСЛАХ

В пробирку помещают 10 мл свежеперегнанного *ацетона Р и* 0,3 мл *воды Р,* прибавляют 0,05 мл раствора 0,4 г/л *бромфенолового синего Р* в *спирте Р;* при необходимости раствор нейтрализуют *0,01 М раствором кислоты хлористоводородной* или *0,01 М раствором натрия гидроксида,* затем прибавляют 10 мл испытуемого масла, встряхивают и оставляют до разделения слоев.

Для изменения окраски верхнего слоя в желтую должно быть израсходовано не более 0,1 мл *0,01 М раствора кислоты хлористоводородной.*

2.4.20. АНТИОКСИДАНТЫ В ЖИРНЫХ МАСЛАХ

Испытание проводят методом *тонкослойной хроматографии (2.2.27),* используя пластинки, покрытые тонким слоем *силикагеля G Р.* Перед применением пластинки высушивают при температуре 130°С в течение 2 ч.

Испытуемый раствор (а). 20 г испытуемого образца, взятого из среднего слоя масла помещают в делительную воронку, прибавляют 50 мл *петролейного эфира Р* и энергично встряхивают с двумя порциями по 30 мл метанола (75 % об/об). После четкого разделения слоев нижние, метанольные, слои объединяют и выпаривают при пониженном давлении и возможно более низкой температуре в атмосфере азота. Остаток растворяют в 5 мл *хлороформа, свободного от этанола Р.* Хранят в плотно укупоренном сосуде.

Испытуемый раствор (b). Слой петролейного эфира (верхний слой), полученный при приготовлении испытуемого раствора (а), осторожно выпаривают до сухого остатка. Прибавляют 0,5 г *пирогаллола Р,* растворенного

в 100 мл *этанола Р,* затем 15 мл свежеприготовленного раствора 330 г/л *натрия гидроксида Р* и кипятят с обратным холодильником в течение 30 мин. Охлаждают, прибавляют 250 мл *воды Р* и извлекают неомыляемые вещества тремя порциями по 100 мл *петролейного эфира Р.* Объединенные извлечения петролейного эфира промывают *водой Р* до отсутствия щелочной реакции и выпаривают до сухого остатка. Остаток растворяют в 5 мл *хлороформа, свободного от этанола Р.* Хранят в хорошо укупоренном сосуде.

А. НЕПОЛИГИДРОКСИАНТИОКСИДАНТЫ

Пластинку помещают в хроматографическую камеру с *хлороформом, свободным от этанола, Р.* Когда фронт растворителя пройдет около 12 см от нижнего края пластинки, пластинку вынимают из камеры, высушивают в течение 20 мин на воздухе, затем в течение 20 мин в эксикаторе под вакуумом.

На линию старта хроматографической пластинки, подготовленной, как указано выше, в стартовую точку №1 (см. Рис. 2.4.20.-1) наносят испытуемый раствор (а) в виде пятна диаметром не более 5 мм. Объем наносимого испытуемого раствора (а) зависит от его концентрации и составляет обычно от 2 мкл до 10 мкл. В стартовые точки №№2 и 3 (см. Рис. 2.4.20.-1) наносят по 2 мкл окрашенного раствора, содержащего по 0.1 г/л *диметилового желтого Р, судана красного GР* и *индофенолового синего Р* в *бензоле Р.* На пластинке отмечают длину пробега (10 см) в двух направлениях. В первый раз пластинку хроматографируют в камере с *хлороформом, свободным от этанола Р.* Пластинку высушивают на воздухе в течение 10 мин, затем поворачивают на 90° и хроматографируют в камере с *бензолом Р.* Пластинку высушивают на воздухе в течение 5 мин и опрыскивают раствором 200 г/л *кислоты фосфорномолибденовой Р* в *этаноле Р* до устойчивого окрашивания пластинки в желтый цвет. Через 2 мин начинают проявляться синие пятна. В течение первых 5-10 мин пластинку обрабатывают парами аммиака до тех пор, пока фон не станет чисто белым. На пластинке остаются синие, светло-фиолетовые или зеленоватые пятна.

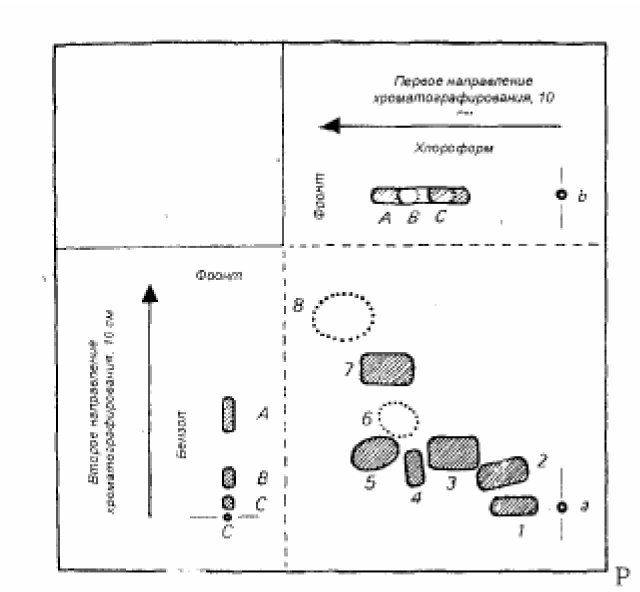


Рисунок 2.4.20.-1.Типичные хроматограммы антиоксидантов (Методы А и С)

а — стартовая точка №1+пятно галлатов+пятно нордигидрогваяретовой кислоты
b — стартовая точка №2
с — стартовая точка №3
1 — гваяковая смола
2 — 3-(1,1 – Диметилэтил)-4-метоксифенол
3 — 2-(1,1 – Диметилэтил)-4-метоксифенол
4 — 2.2.5,7,8 – Пентаметил-6-хроманол
5 — тетраэтилтиурам дисульфид
6 — а-Токоферол
7 — дибутилгидроксианизол
8 — бутилгидроксианизол
А — жёлтый
В — красный
С — синий

Хроматограмму оценивают, сравнивая с Рис. 2.4.20.-1. Если на линии старта обнаруживаются синие пятна, проводят разделение и идентификацию полигидроксиантиоксидантов (метод В).

В. ПОЛИГИДРОКСИАНТИОКСИДАНТЫ

На линию старта хроматографической пластинки наносят 1 мкл, 2 мкл, 4 мкл и 6 мкл испытуемого раствора (а), а также от 1 мкл до 2 мкл окрашенного раствора, приготовленного, как указанно в методе А. Пластинку помещают в камеру со смесью растворителей: *кислота уксусная ледяная Р-бензол Р-петролейный эфир Р* (30:60:60). Когда фронт растворителей пройдёт около 13 см от линии старта, пластинку вынимают из камеры, высушивают на воздухе, опрыскивают раствором 200 г/л кис*лоты фосфорномолибденовой Р* в *этаноле Р* и продолжают проявление по методике, описанной для идентификации неполигидроксиантиоксидантов.

Хроматограмму оценивают, сравнивая положение пятен на хроматограмме испытуемого раствора с Рис 2.4.20.-2.

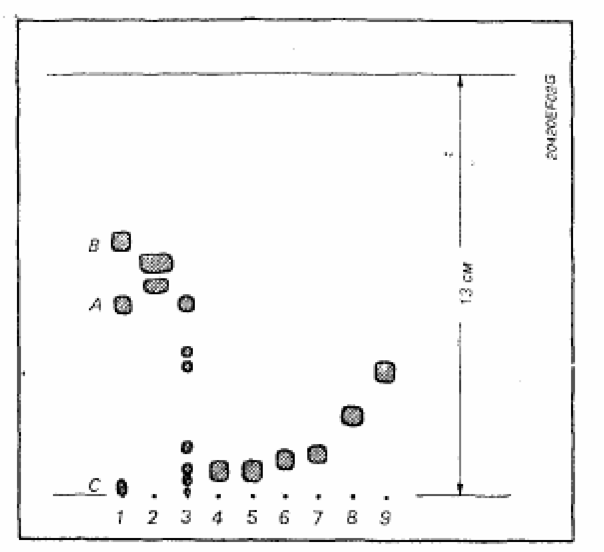


Рисунок 2.4.20.-2. Типичные хроматограммы полигидроксиантиоксидантов (метод B)

1 — окрашенный раствор
2 — бутилированный гидроксианизол
3 — гваяковая смола
4 — нордигидрогваяретовая кислота
5 — метилгаллат
6 — этилгаллат
7 — пропилгаллат
8 — октилгаллат
9 — добецилгаллат
А — жёлтый
В — красный
С — синий

С. АНТИОКСИДАНТЫ, НЕИЗВЛЕКАЕМЫЕ МЕТАНОЛОМ

Испытание проводят методом тонкослойной хроматографии на другой пластинке. Хроматографирование проводят по методике, описанной для неполигидроксиантиоксидантов, используя вместо испытуемого раствора (a) испытуемый раствор (b). Пластинку опрыскивают раствором 10 г/л *дихлорхинонхлоримида Р* в *этаноле Р*. Пятна проявляются в течение 15 мин. Хроматограмму оценивают, сравнивая с Рис. 2.4.20 – 1. Зоны, отмеченные пунктиром, соответствуют α-токоферолу и бутилированному гидрокситолуолу. Пятна β- и γ-токоферола находятся в зоне, соответствующей 2-(1,1-диметилэтил)-4-метоксифенолу.

Если в испытуемом веществе в существенном количестве присутствует бутилированный гидрокситолуол, его определяют по методу А.

2.4.21. ПОСТОРОННИЕ МАСЛА В ЖИРНЫХ МАСЛАХ МЕТОДОМ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Испытание проводят методом *тонкослойной хроматографии (2.2.27)* с использованием в качестве тонкого слоя *кизельгура G Р.* Пластинку

пропитывают, поместив в камеру, содержащую смесь *вазелинового масла Р* и *петролейного эфира Р* (10:90) в таком количестве, чтобы нижний край пластинки погрузился на 5 мм ниже поверхности жидкости. Когда смесь для пропитывания поднимется не менее чем на 12 см от нижнего края пластинки, ее вынимают из камеры и дают растворителю испариться в течение 5 мин. Последующее хроматографирование проводят в том же направлении, что и пропитывание.

Приготовление смеси жирных кислот. К 2 г масла прибавляют 30 мл 0,*5 М раствора калия гидроксида спиртового* и нагревают с обратным холодильником в течение 45 мин. Прибавляют 50 мл *воды Р,* оставляют до охлаждения, переносят в делительную воронку и встряхивают с тремя порциями *эфира Р,* по 50 мл каждая. Эфирные слои отделяют, водный слой подкисляют *кислотой хлористоводородной Р* и вновь встряхивают с тремя порциями *эфира Р,* по 50 мл каждая. Все эфирные слои объединяют и встряхивают с тремя порциями *воды Р,* по 10 мл каждая, отбрасывая промывные воды. Объединенные эфирные слои высушивают над *натрия сульфатом безводным Р* и фильтруют. Затем эфир выпаривают на водяной бане, а из остатка готовят испытуемый раствор или раствор сравнения. Жирные кислоты также можно извлечь из раствора, полученного в ходе определения неомыляемых веществ.

Испытуемый раствор. 40 мг смеси жирных кислот, полученной из испытуемого масла, растворяют в 4 мл *хлороформа Р*.

Раствор сравнения. 40 мг смеси жирных кислот, полученной из смеси 19 объемов *кукурузного масла Р* и 1 объема *рапсового масла Р,* растворяют в 4 мл *хлороформа Р.*

На линию старта хроматографической пластинки наносят по 3 мкл каждого раствора. Помещают пластинку в камеру со смесью растворителей: *вода Р - кислота уксусная ледяная Р* (10:90). Когда фронт растворителей пройдет 8 см от линии старта, пластинку вынимают из камеры, высушивают при температуре 110°С в течение 10 мин и оставляют до охлаждения. Затем, если нет других указаний в частной статье, пластинку помещают в закрытую плотно подогнанной крышкой хроматографическую камеру, предварительно насыщенную парами йода (на дно камеры в выпарительной чашке помещен *йод Р).* Через некоторое время проявляются коричневые или желтовато-коричневые пятна. Пластинку вынимают из камеры и оставляют на несколько минут. Когда коричневый фон исчезнет, пластинку опрыскивают *раствором крахмала Р.* Появляющиеся синие пятна могут приобретать коричневую окраску при высушивании и вновь становятся синими после опрыскивания *водой Р.*

На хроматограмме испытуемого раствора всегда должны обнаруживаться пятно с R_f около 0,5 (олеиновая кислота) и пятно с R_f около 0,65 (линолевая кислота), соответствующие пятнам на хроматограмме раствора сравнения. На хроматограммах некоторых масел может обнаруживаться пятно с R_f около 0,75 (линоленовая кислота). Путем сравнения пятен на хроматограмме испытуемого раствора с пятнами на хроматограмме раствора сравнения убеждаются в отсутствии на хроматограмме испытуемого раствора пятна с R_f около 0,25 (эруковая кислота).

2.4.22. ПОСТОРОННИЕ ЖИРНЫЕ КИСЛОТЫ В МАСЛАХ МЕТОДОМ ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Испытание на посторонние жирные кислоты проводят путем перевода жирных кислот, содержащихся в испытуемом масле, в метиловые эфиры.

МЕТОД А

Этот метод неприменим для масел, содержащих глицериды жирных кислот с эпокси-, гидроксиэпокси-, циклопропиловыми или циклопропениловыми группами,а также для масел, в составе которых большая часть жирных кислот имеет длину цепи менее восьми атомов углерода, и для масел с кислотным числом более 2,0.

Испытание проводят методом *газовой хроматографии (2.2.28).*

Испытуемый раствор. Испытуемое масло высушивают перед метилированием, если это указано в частной статье. 1,0 г масла помещают в круглодонную колбу вместимостью 25 мл со шлифом, снабженную обратным холодильником и газоотводной трубкой. В колбу прибавляют 10 мл *метанола безводного Р,* 0,2 мл раствора 60 г/л *калия гидроксида Р в метаноле Р,* присоединяют обратный холодильник и, пропуская через смесь *азот Р* со скоростью около 50 мл/мин, встряхивают и нагревают до кипения. Когда раствор станет прозрачным (обычно через 10 мин), продолжают нагревание в течение последующих 5 мин. Затем колбу охлаждают под проточной водой и содержимое переносят в делительную воронку. Колбу промывают 5 мл *гептана Р,* переносят смывы в ту же делительную воронку и встряхивают. Прибавляют 10 мл раствора 200 г/л *натрия хлорида Р* и энергично встряхивают. Оставляют до расслоения, затем переносят органический слой в сосуд, содержащий *натрия сульфат безводный Р* и через некоторое время фильтруют.

Допускается применение других методик перевода содержащихся в испытуемом масле жирных кислот в метиловые эфиры, указанных в частной статье.

Раствор сравнения (а). Готовят 0,50 г смеси веществ, применяемых для калибровки (калибровочной смеси), состава, приведенного в одной из Табл. 2.4.22, как указано в частной статье (если в частной статье не указан определенный раствор, готовят смесь, состав которой приведен в Табл. 2.4.22.-1). Смесь растворяют в *гептане Р* и доводят объем раствора этим же растворителем до 50,0 мл.

Табл. 2.4.22.-1

*Приготовление смеси веществ, применяемых для калибровки**

			Состав (в процентах *м/м)*	
Вещество для калибровки	Эквивалент длины цепи**		Изотермический режим	Линейный градиент температуры
	(1)	(2)		
Метиллаурат Р	12.0	12.0	5	10
Метилмиристат Р	14.0	14.0	5	15
Метилпальмитат Р	16.0	16.0	10	15
Метилстеарат Р	18.0	18.0	20	20
Метиларахидат Р	20.0	20.0	40	20
Метилолеат Р	18.6	18.3	20	20

Табл. 2.4.22.-2

*Приготовление смеси веществ, применяемых для калибровки**

			Состав (в процентах *м/м.)*	
Вещество для калибровки	Эквивалент длины цепи**		Изотермический режим	Линейный градиент температуры
	(1)	(2)	(2)	
Метилкапроат Р	6.0	6.0	5	10
Метилкаприлат Р	8.0	8.0	5	35
Метилкапрат Р	10.0	10.0	10	35
Метиллаурат Р	12.0	12.0	20	10
Метилмиристат Р	14.0	14.0	40	10

Табл. 2.4.22.-3

*Приготовление смеси веществ, применяемых для калибровки**

			Состав (в процентах *м/м)*	
Вещество для калибровки	Эквивалент длины цепи**		Изотермический режим	Линейный градиент температуры
	(1)	(2)		
Метилмиристат Р	14.0	14.0	5	15
Метилпальмитат Р	16.0	16.0	10	15
Метилстеарат Р	18.0	18.0	15	20
Метиларахидат Р	20.0	20.0	20	15
Метилолеат Р	18.6	18.3	20	15
Метилэйкозаноат Р	20.2	20.2	10	10
Метилбегенат Р	22.0	22.0	10	5
Метиллигноиерат Р	24.0	24.0	10	5

*Для газовой хроматографии с применением капиллярной колонки и делением потока рекомендуется прибавлять к смеси веществ, применяемых для калибровки, компоненты с большей длиной цепи.

**Эти значения, вычисленные с использованием калибровочной кривой, даны в качестве примера для колонки, заполненной *полиэтиленгликоль сукцинатом Р* (1) и *макроголом 20 000 Р* (2).

Раствор сравнения (b). 1.0 мл раствора сравнения (а) доводят *гептаном Р* до 10.0 мл.

Хроматографируют на газовом хроматографе с пламенно-ионизационным детектором в следующих условиях:

- колонка стеклянная или из нержавеющей стали длиной от 2 м до 3 м и внутренним диаметром от 2 мм до 4 мм, заполненная *диатомитом носителем для газовой хроматографии Р* с размером частиц от 125 мкм до 200 мкм, на который нанесено от 5% до 15% *полиэтиленгликольсукцината Р* или *полиэтиленгликольадипината Р*;
- газ-носитель – *азот для хроматографии Р*;
- скорость газа-носителя – 25 мл/мин;
- температура колонки – 180°С;
- температура инжектора и детектора – 200°С.

При необходимости или если указано в частной статье, температуру колонки увеличивают от 120°С до 200°С со скоростью 5°С в мин.

Хроматографировать возможно также на газовом хроматографе с пламенно–ионизационным детектором в следующих условиях:

- колонка капиллярная стеклянная или кварцевая длиной от 10 м до 30 м и внутренним диаметром от 0.2 мм до 0.8 мм, внутренняя поверхность которой покрыта слоем *поли[(цианопропил)(метил)][(фенил) (метил)]силоксана Р* или *макрогола 20 000 Р* толщиной от 0,1 мкм до 0,5 мкм или другой подходящей неподвижной фазой;
- газ-носитель – *гелий для хроматографии Р* или *водород для хроматографии Р;*
- скорость газа-носителя – 1,3 мл/мин (для колонки с внутренним диаметром 0,32 мм);
- деление потока – 1:100 или менее в зависимости от внутреннего диаметра применяемой колонки (в случае использования колонки с внутренним диаметром 0,32 мм деление потока должно составлять 1:50);
- температура колонки – от 160°C до 200°C, в зависимости от длины колонки и используемой неподвижной фазы (для колонки длиной 30 м, покрытой слоем *макрогола 20 000 Р,* температура должна составлять 200°C);
- температура инжектора и детектора – 250°C.

При необходимости или если указано в частной статье, температуру колонки увеличивают от 170°C до 230°C со скоростью 3°C в мин (для колонки, покрытой слоем *макрогола 20 000 Р)*

Хроматографируют 0,5 мкл раствора сравнения (а). Чувствительность системы регулируют таким образом, чтобы высота основного пика на полученной хроматограмме составляла от 50% до 70% шкалы регистрирующего устройства.

Определяют времена удерживания жирных кислот, входящих в состав калибровочной смеси. Хроматографируют 1 мкл раствора сравнения (b) и рассчитывают отношение сигнал/шум для пика, соответствующего метилмиристату.

Хроматографируют от 0,5 мкл до 1,0 мкл испытуемого раствора. Время хроматографирования должно в 2,5 раза превышать время удерживания метилолеата. Хроматограмму оценивают, как описанно ниже.

При использовании калибровочных смесей №1 или №3 хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:
- на хроматограмме раствора сравнения (а) число теоретических тарелок *(n) (2.2.28),* вычисленное для пика, соответствующего метилстеарату, составляет не менее 2000 для набивной колонки и не менее 30 000 для капиллярной колонки;
- на хроматограмме раствора сравнения (а) коэффициент разделения *(R_S) (2.2.28)* пиков, соответствующих метилолеату и метилстеарату, составляет не менее 1,25 для набивной колонки и не менее 1,8 для капиллярной колонки;
- на хроматограмме раствора сравнения (b) отношение сигнал/шум *(2.2.28)* для пика метилмиристата составляет не менее 5.

При использовании калибровочной смеси №2 хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:
- на хроматограмме раствора сравнения (а) число теоретических тарелок *(n) (2.2.28),* вычисленное для пика, соответствующего метилкапрату, составляет не менее 1500 для набивной колонки и не менее 15 000 для капиллярной колонки;
- на хроматограмме раствора сравнения (а) коэффициент разделения *(R_S) (2.2.28)* пиков, соответствующих метилкаприлату и метилкапрату, составляет не менее 2 для набивной колонки и не менее 4 для капиллярной колонки;

- на хроматограмме раствора сравнения (b) отношение сигнал/шум *(2.2.28)* для пика метилкапроата составляет не менее 5.

ОЦЕНКА ХРОМАТОГРАММ

Следует избегать условий хроматографирования, которые могут дать неразделенные пики (наличие компонентов с небольшим различием между временами удерживания, например, линоленовая и арахидоновая кислоты.

Качественный анализ. Строят калибровочную кривую, используя хроматограммы раствора сравнения (а) и данные Таблиц 2.4.22.

а) Для хроматограмм, полученных в изотермическом режиме, вычисляют логарифмы приведенных времен удерживания как функцию эквивалента числа атомов углерода в жирных кислотах. Калибровочная кривая насыщенных кислот представляет собой прямую линию. Логарифмы приведённых времен удерживания ненасыщенных кислот расположены на этой линии как точки, соответствующие не целым значениям «эквивалента длины цепи». Идентификацию компонентов жирных кислот испытуемого масла проводят, рассчитывааая логарифмы приведённых времён удерживания пиков, полученных на хроматограмме испытуемого раствора, и устанавливая по калибровочной кривой «эквивалентны длины цепи».

Допускается идентификация жирных кислот испытуемого масла путем сравнения времен удерживания пиков на хроматограмме испытуемого раствора с временами удерживания пиков на хроматограмме раствора сравнения или на стандартной хроматограмме, описанной в частной статье.

Приведенное время удерживания - разница между временем удерживания пика вещества и временем удерживания несорбирующегося (в условиях определения) вещества.

б) Для хроматограмм, полученных с использованием линейного градиента температуры, определяют времена удерживания, находящиеся в зависимости от числа атомов углерода в жирных кислотах, и идентифицируют жирные кислоты, входящие в состав испытуемого масла, путем сравнения с калибровочной кривой.

Количественный анализ. Обычно используют метод внутренней нормализации; при этом сумму площадей всех пиков на хроматограмме, кроме пиков, относящихся к растворителю, принимают за 100%. Рекомендуется применение электронного интегратора. Содержание каждого компонента вычисляют как отношение площади соответствующего пика к сумме площадей всех пиков. Пики, площадь которых составляет менее 0.05% от суммы площадей всех пиков, не учитывают, если нет других указаний в частной статье.

В определенных случаях, т.е. при наличии жирных кислот с 12 или менее атомами углерода, в частной статье должен быть указан поправочный коэффициент для преобразования площадей пиков в проценты *(м/м).*

МЕТОД В

Этот метод неприменим для масел, содержащих глицериды жирных кислот с эпокси-, гидроксиэпокси-, циклопропиловыми и циклопропениловыми группами и для масел с кислотным числом более 2,0.

Испытуемый раствор. 0,100 г испытуемого вещества помещают в центрифужную пробирку с завинчивающейся крышкой, растворяют в 1 мл

гептана Р и 1 мл *диметилкарбоната Р* и энергично перемешивают при умеренном нагревании (от 50°C до 60°C). К еще теплому раствору прибавляют 1 мл раствора 12 г/л *натрия Р* в *метаноле безводном Р,* приготовленного с необходимыми предосторожностями, и энергично перемешивают в течение 5 мин. Прибавляют, 3 мл *воды дистиллированной Р* и энергично перемешивают в течение 30 с. Центрифугируют в течение 15 мин с ускорением 1500 g. Хроматографируют 1 мкл органического слоя.

Растворы сравнения и оценка хроматограмм. Если в частной статье нет других указаний, поступают, как указано в Методе А.

Хроматографируют на газовом хроматографе с пламенно-ионизационным детектором в следующих условиях:

- кварцевая колонка длиной 30 м, с внутренним диаметром 0,25 мм, покрытая слоем *макрогола 20 000 Р* толщиной 0,25 мкм;
- газ-носитель – *гелий для хроматографии Р;*
- скорость газа-носителя – 0,9 мл/мин;
- деление потока – 1:100;
- температура колонки и скорость подъема температуры – по следующей программе:

	Время (мин)	Температура (°C)	Скорость подъема температуры (°C/мин)	Примечания
Колонка	0-15	100	-	Изотермический режим
	15-36	100→225	10	Линейный градиент температуры
	36-61	225	-	Изотермический режим
Инжектор		250		
Детектор		250		

МЕТОД С

Этот метод неприменим для масел, содержащих глицериды жирных кислот с эпокси-, гидроперекисными, альдегидными, кетоновыми, циклопропиловыми и циклопропениловыми группами и сопряженными полиненасыщенными и ацетиленовыми компонентами из-за частичного или полного разрушения этих групп.

Испытуемый раствор. 0,10 г испытуемого вещества помещают в коническую колбу вместимостью 25 мл, растворяют в 2 мл раствора 20 г/л *натрия гидроксида Р* в *метаноле Р* и кипятят с обратным холодильником в течение 30 мин. Затем через холодильник прибавляют 2,0 мл *раствора бора фторида в метаноле Р* и кипятят еще 30 мин, после чего прибавляют через холодильник 4,0 мл *гептана Р* и кипятят 5 мин. Охлаждают, прибавляют 10,0 мл *раствора натрия хлорида насыщенного Р,* встряхивают в течение 15 с и прибавляют такой объем *раствора натрия хлорида насыщенного Р,* чтобы верхний слой поднялся к горлу колбы. Отбирают 2,0 мл верхнего слоя, помещают в делительную воронку, промывают тремя порциями *воды Р,* по 2 мл каждая, и высушивают над *натрия сульфатом безводным Р.*

Растворы сравнения, хроматографическая методика и оценка хроматограмм. Если в частной статье нет других указаний, поступают как указано в методе А.

2.4.23. СТЕРИНЫ В ЖИРНЫХ МАСЛАХ

ОТДЕЛЕНИЕ СТЕРИНОВОЙ ФРАКЦИИ

Получают неомыляемые вещества жирного масла и затем отделяют стериновую фракцию методом *тонкослойной хроматографии* (2.2.27), используя пластинки, покрытые тонким слоем *силикагеля G P* толщиной от 0,3 мм до 0,5 мм.

Испытуемый раствор (а). В колбу вместимостью 150 мл, снабженную обратным холодильником, помещают раствор 2 г/л *бетулина Р* в *метиленхлориде Р* в таком объеме, чтобы количество бетулина соответствовало около 10% содержания стеринов в образце, взятом для определения (т.е. в случае оливкового масла прибавляют 500 мкл, в случае других растительных масел 1500 мкл раствора бетулина). Выпаривают до сухого остатка в токе *азота Р.* Если в частной статье определяется только содержание индивидуальных стеринов в процентах к стериновой фракции, раствор бетулина можно не прибавлять.

В колбу помещают 5,00 г испытуемого вещества. Прибавляют 50 мл *2 М раствора калия гидроксида спиртового Р* и нагревают на водяной бане в течение 1 ч, часто перемешивая содержимое колбы круговыми движениями. Охлаждают до температуры ниже 25°С и количественно переносят содержимое колбы в делительную воронку, содержащую 100 мл *воды Р.* Осторожно встряхивают с тремя порциями *эфира, свободного от пероксидов Р,* по 100 мл каждая. Эфирные слои собирают в другую делительную воронку, содержащую 40 мл *воды Р,* слегка встряхивают в течение нескольких минут, оставляют до расслоения и отбрасывают водный слой. Эфирный слой встряхивают с несколькими порциями воды *Р,* по 40 мл каждая, до тех пор, пока водный слой не перестанет давать щелочную реакцию по фенолфталеину. Эфирный слой количественно переносят в колбу, высушенную до постоянной массы, промывая делительную воронку *эфиром, свободным от пероксидов Р.* Эфир выпаривают с необходимыми предосторожностями, к остатку прибавляют 6 мл *ацетона Р.* Осторожно удаляют растворитель в токе *азота Р.* Высушивают до постоянной массы при температуре от 100°С до 105°С, охлаждают в эксикаторе и взвешивают. Остаток растворяют в минимальном объеме *метиленхлорида Р.*

Испытуемый раствор (b). В колбу вместимостью 150 мл, снабженную обратным холодильником, помещают 5,00 г *рапсового масла Р* и далее поступают, как указано в приготовлении испытуемого раствора (а), начиная со слов «Прибавляют 50 мл *2 М раствора калия гидроксида спиртового Р*».

Испытуемый раствор (c). В колбу вместимостью 150 мл, снабженную обратным холодильником, помещают 5,00 г *подсолнечного масла Р* и далее поступают, как указано в приготовлении испытуемого раствора (а), начиная со слов «Прибавляют 50 мл *2 М раствора калия гидроксида спиртового* Р».

Раствор сравнения. 25 мг *холестерина Р* и 10 мг *бетулина Р* растворяют в 1 мл *метиленхлорида Р.*

Для каждого испытуемого раствора используют отдельную пластинку. На каждую из пластинок наносят полосой размером (20x3) мм 20 мкл раствора сравнения и полосой размером (40x3) мм 400 мкл испытуемого раствора (а) или испытуемого раствора (b), или испытуемого раствора (c), соответственно. Пластинки помещают в камеру со смесью растворителей *эфир Р - гексан Р* (35:65). Когда фронт растворителей пройдет 18 см от линии старта, пластинки вынимают из камеры, высушивают в токе *азота Р,* опрыскивают раствором 2 г/л *дихлорфлуоресцеина Р в этаноле Р* и просматривают в УФ–

свете при длине волны 254 нм. На хроматограмме раствора сравнения обнаруживаются полосы, соответствующие холестерину и бетулину. На хроматограммах испытуемых растворов обнаруживаются полосы с близкими значениями R_f, соответствующие стеринам. С хроматограммы каждого испытуемого раствора снимают область покрытия, на которой расположены полосы стеринов, а также дополнительно зоны на 2-3 мм выше и ниже видимых зон раствора сравнения и помещают раздельно в три колбы вместимостью 50 мл каждая. В каждую колбу прибавляют по 15 мл теплого *метиленхлорида Р* и встряхивают. Каждый раствор фильтруют через стеклянный фильтр (40) или подходящую фильтровальную бумагу и промывают каждый фильтр тремя порциями *метиленхлорида Р,* по 15 мл каждая. Объединенные фильтраты и смывы помещают в три колбы, высушенные до постоянной массы, выпаривают до сухого остатка в токе *азота Р* и взвешивают.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТЕРИНОВ

Определение стеринов проводят методом *газовой хроматографии (2.2.28).*

Все операции проводят, защищая растворы и реактивы от влаги, растворы готовят непосредственно перед применением.

Испытуемый раствор. К выделенным из испытуемого вещества методом тонкослойной хроматографии стеринам прибавляют свежеприготовленную смесь: *хлортриметилсилан - гексаметилдисилазан Р - пиридин безводный Р* (1:3:9). (0,02 мл смеси на миллиграмм остатка). Осторожно встряхивают до полного растворения остатка и оставляют в эксикаторе над *фосфора (v) оксидом Р* на 30 мин. При необходимости центрифугируют и используют надосадочную жидкость.

Раствор сравнения (а). К 9 частям стеринов, выделенных из *рапсового масла Р* методом тонкослойной хроматографии, прибавляют 1 часть *холестерина Р.* К полученной смеси прибавляют свежеприготовленную смесь: *хлортриметилсилан - гексаметилдисилазан Р - пиридин безводный Р* (1:3:9) (0,02 мл смеси на миллиграмм смеси стеринов). Осторожно встряхивают до полного растворения остатка и оставляют в эксикаторе над *фосфора (V) оксидом Р* на 30 мин. При необходимости центрифугируют и используют надосадочную жидкость.

Раствор сравнения (b). К стеринам, выделенным из *подсолнечного масла Р* методом тонкослойной хроматографии, прибавляют свежеприготовленную смесь: *хлортриметилсилана Р - гексаметилдисилазан - пиридин безводный Р* (1:3:9) (0,02 мл смеси на миллиграмм смеси стеринов). Осторожно встряхивают до полного растворения остатка и оставляют в эксикаторе над *фосфора (V) оксидом Р* на 30 мин. При необходимости центрифугируют и используют надосадочную жидкость.

Хроматографируют на газовом хроматографе с пламенно-ионизационным детектором в следующих условиях:

- кварцевая колонка длиной от 20 м до 30 м и внутренним диаметром от 0,25 мм до 0,32 мм, покрытая *поли[метил(95)фенил(5)]силоксаном Р* или *поли[метил(94)фенил(5)винил(1)]силоксаном Р с* толщиной слоя 0,5 мкм,
- газ-носитель – *водород для хроматографии Р* (линейная скорость от 30 см/с до 50 см/с) или *гелий для хроматографии Р* (линейная скорость от 20 см/с до 35 см/с). Линейную скорость измеряют следующим способом: в

условиях определения стеринов вводят от 1 мкл до 3 мкл метана или пропана. Измеряют время в секундах, необходимое для прохождения газа через колонку от момента введения до появления пика (t_m). Линейную скорость вычисляют по формуле L/t_m, где L - длина колонки в сантиметрах;

- деление потока – 1:50 или 1:100;
- температура колонки – 260°С;
- температура инжектора – 280°С;
- температура детектора – 290°С.

Хроматографируют в указанных условиях по 1 мкл каждого раствора.

На хроматограмме раствора сравнения *(а)* обнаруживается четыре основных пика, соответствующих холестерину, брассикастерину, кампестерину и β-ситостерину; на хроматограмме раствора сравнения (b) обнаруживается четыре основных пика, соответствующих кампестерину, стигмастерину, β-ситостерину и Δ7-сигмастенолу. Времена удерживания стеринов относительно β-ситостерина даны в Табл. 2.4.23.-1.

Пик внутреннего стандарта (бетулин) должен быть четко отделен от пиков определяемых стеринов.

Идентифицируют пики, обнаруженные на хроматограмме испытуемого раствора, и вычисляют процентное содержание каждого стерина в стериновой фракции испытуемого вещества по формуле:

$$C = \frac{A}{S} \cdot 100$$

где:

С — процентное содержание стеарина;

А — площадь пика, соответствующего определяемому стерину;

S — сумма площадей всех пиков, соответствующих компонентам, указанным в Табл. 2.4.23.-1.

Если это указано в частной статье, вычисляют количество каждого стерина в миллиграммах, содержащееся в 100 г испытуемого вещества, по формуле:

$$C = \frac{A \cdot m_S \cdot 100}{A_S \cdot m}$$

где:

С —количество стеарина в миллиграммах;

А — площадь пика, соответствующего определяемому компоненту;

A_S — площадь пика, соответствующего бетулину;

m — масса навески образца испытуемого вещества, в граммах;

m_S — масса прибавленного *бетулина Р,* в миллиграммах.

Таблица 2.4.23.-1

Времена удерживания стеринов по отношению к времени удерживания β-ситостерина для двух различных колонок

	Поли[метил(9 5) -фенил(5)]силоксан	Поли[метил(94)-фенил(5) вннил(1)]-силоксан
Холестерин	0.63	0.67
Брассикастерин	0.71	0.73
24-Метиленхолестерин	0.80	0.82
Кампестерин	0.81	0.83
Кампестанол	0.82	0.85
Стигмастерин	0.87	0.88
Δ-Кампестерин	0.92	0.93
Δ5,23-Стигмастадиенол	0.95	0.95
Клеростерин	0.96	0.96
β-Ситостерин	1	1
Ситостанол	1.02	1.02
Δ5-Авенастерин	1.03	1.03
Δ5,24-Стигмастадиенол	1.08	1.08
Δ7-Стигмастенол (1)	1.12	1.12
Δ7-Авенастерин	1.16	1.16
Бетулин	1.4	1.6

(1) Δ7-Стигмастенол в литературе может упоминаться как Δ7-Стигмастерин

2.4.24. ИДЕНТИФИКАЦИЯ ОСТАТОЧНЫХ РАСТВОРИТЕЛЕЙ И ИХ КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Методики испытаний, приведенные в этой общей статье, могут быть использованы:

1) для идентификации основной массы остаточных растворителей классов 1 и 2 в субстанциях, вспомогательных веществах и готовых лекарственных средствах, если остаточные растворители неизвестны;
2) для определения предельного содержания растворителей классов 1 и 2, если они присутствуют в субстанциях, вспомогательных веществах и готовых лекарственных средствах;
3) для количественного определения растворителей класса 2, если их предельное содержание превышает 1000 ppm (0,1%), или, если необходимо, для количественного определения растворителей класса 3.

Остаточные растворители классов 1, 2 и 3 перечислены в статье *5.4. «Остаточные количества органических растворителей».*

Для приготовления испытуемых растворов ниже приведены три растворителя, а также условия введения газовых проб при парофазной газовой хроматографии. Хотя описаны две хроматографические системы, предпочтительнее использовать систему А, система В обычно используется для идентификации. Выбор методики приготовления испытуемых растворов зависит от растворимости анализируемого вещества и, в первую очередь, от класса контролируемого остаточного растворителя.

Формамид, 2-этоксиэтанол, 2-метоксиэтанол, этиленгликоль, N-метилпирролидон и сульфолан следует определать другими валидированными методиками.

Если приведенную ниже методику испытаний применяют для количественного определения остаточных растворителей в конкретном веществе, она должна быть валидирована.

МЕТОДИКА

Испытания проводят методом парофазной газовой хроматографии (2.2.28).

Пробоподготовка 1. Применяют при определении остаточных растворителей в веществах, растворимых в воде.

Исходный раствор испытуемого образца (1). 0,250 г испытуемого образца растворяют в *воде Р* и доводят объем раствора этим же растворителем до 25,0 мл.

Пробоподготовка 2. Применяют при определении остаточных растворителей в веществах, нерастворимых в воде.

Исходный раствор испытуемого образца (2). 0,250 г испытуемого образца растворяют в *N,N-диметилформамиде Р* (ДМФ) и доводят объем раствора этим же растворителем до 25,0 мл.

Пробоподготовка 3. Применяют при контроле N,N-диметилацетамида и/или N,N-диметилформамида, если известно или допускается, что один или оба растворителя присутствуют в испытуемом образце.

Исходный раствор испытуемого образца (3). 0,250 г испытуемого образца растворяют в *1,3-диметил-2-диметил-2-имидазолидоне Р* (ДМИ) и доводят объем раствора этим же растворителем до 25,0 мл.

Если ни одна из вышеприведенных методик пробоподготовки не подходит, возможно использование другого растворителя и других подходящих условий парофазного анализа.

Раствор остаточного растворителя (а). 1,0 мл *ФСО раствора остаточного растворителя класса 1* доводят водой Р до 100,0 мл. 1,0 мл полученного раствора доводят водой Р до 10,0 мл.

Раствор остаточных растворителей (b). Соответствующие количества остаточных растворителей класса 2 растворяют в *диметилформамиде Р* и доводят объем водой Р до 100,0 мл. Объем полученного раствора доводят *водой Р* до концентрации, соответствующей 1/20 значений пределов концентраций, указанных в Табл.1 или Табл.2 статьи *5.4. «Остаточные количества органических растворителей».*

Раствор остаточных растворителей (с). 1,00 г растворителя или растворителей, присутствующих в испытуемом образце, растворяют в *диметилсульфоксиде Р* или в *воде Р* и доводят объем раствора *водой Р* до концентрации, соответствующей 1/20 значений пределов концентраций, указанных в Табл.1 или Табл.2 статьи *5.4. «Остаточные количества органических растворителей».*

Холостой раствор (контроль). Готовят аналогично раствору остаточных растворителей (c), но без добавления остаточных растворителей (используют для проверки отсутствия мешающих пиков).

Испытуемый раствор. 5,0 мл исходного раствора испытуемого образца, подготовленного в соответствии с методикой пробоподготовки, и 1,0 мл холостого раствора помещают во флакон.

Раствор сравнения (a) (класс 1). 1,0 мл раствора остаточного растворителя (a) и 5,0 мл подходящего растворителя помещают во флакон.

Раствор сравнения (a_1) (класс 1). 5,0 мл исходного раствора испытуемого образца, подготовленного в соответствии с методикой пробоподготовки, и 1,0 мл раствора остаточного растворителя (a) помещают во флакон.

Раствор сравнения (b) (класс 2). 1,0 мл раствора остаточного растворителя (b) и 5,0 мл подходящего растворителя помещают во флакон.

Раствор сравнения (c). 5,0 мл исходного раствора испытуемого образца, подготовленного в соответствии с методикой пробоподготовки, и 1,0 мл раствора остаточного растворителя (c) помещают во флакон.

Раствор сравнения (d). 1,0 мл холостого раствора и 5,0 мл подходящего растворителя помещают во флакон.

Флаконы плотно закрывают резиновыми пробками, покрытыми политетрафторэтиленом, и обжимают алюминиевыми колпачками. Встряхивают до получения однородного раствора.

Для проведения парофазного анализа могут быть использованы следующие условия:

Параметры хроматографической системы	**Методика пробоподготовки**		
	1	**2**	**3**
Равновесная температура (°C)	80	105	80
Время достижения равновесия (мин)	60	45	45
Температура линии подачи газовой пробы (°C)	85	110	105
Газ-носитель: *азот для хроматографии Р* или *гелий для хроматографии Р* под соответствующим давлением			
Время нахождения под давлением (с)	30	30	30
Объем вводимой пробы (мл)	1	1	1

Для проведения хроматографического анализа могут быть использованы следующие системы.

Система А:

- колонка кварцевая капиллярная 30 м х 0,32 мм или 30 м х 0,53 мм, покрытая слоем поперечносшитого полимера с 6% полицианопропилфенилсилоксана и 94% полидиметилсилоксана толщиной 1,8 мкм или 3 мкм;

- газ-носитель: *азот для хроматографии Р* или *гелий для хроматографии Р,* с делением потока 1:5 и линейной скоростью газа-носителя около 35 см/с*;*

- пламенно-ионизационный детектор (для хлорсодержащих остаточных растворителей класса 1 может быть также использован масс-спектрометрический детектор или детектор электронного захвата);

- температура колонки : изотермический режим при 40°С в течение 20 минут с последующим программированным повышением температуры со скоростью 10°С/мин до 240°С, затем изотермический режим при температуре 240°С в течение 20 минут;

- температура блока ввода проб - 140 °С;

- температура детектора -250 °С.

Если возможно мешающее влияние основного вещества (матрицы), используют систему В.

Система В:

- колонка кварцевая капиллярная 30 м х 0,32 мм или 30 м х 0,53 мм, покрытая слоем *макрогола 20 000 Р* толщиной 0,25 мкм;

- газ-носитель: *азот для хроматографии Р* или *гелий для хроматографии Р,* с делением потока 1:5 и линейной скоростью газа-носителя около 35 см/с*;*

- пламенно-ионизационный детектор (для хлорсодержащих остаточных растворителей класса 1 может быть также использован масс-спектрометрический детектор или детектор электронного захвата);

- температура колонки : изотермический режим при 50°С в течение 20 минут с последующим программированным повышением температуры со скоростью 6°С/мин до 165°С, затем изотермический режим при температуре 165°С в течение 20 минут;

- температура блока ввода проб -140 °С;

- температура детектора -250 °С.

Проверка пригодности хроматографической системы А

Хроматографическая система А считается пригодной, если выполняются следующие условия:

- вводят 1 мл равновесной газовой фазы раствора сравнения (a_1) и записывают хроматограмму в таких условиях, чтобы можно было измерить отношение сигнал/шум для 1,1,1-трихлорэтана; отношение сигнал/шум должно быть не менее 5. Типичная хроматограмма представлена на Рис. 2.4.24.-1;

- вводят 1 мл равновесной газовой фазы раствора сравнения (а) в колонку; пики, соответствующие остаточным растворителям класса 1 должны обнаруживаться;

- вводят 1 мл равновесной газовой фазы раствора сравнения (b) в колонку и записывают хроматограмму в таких условия, чтобы можно было определить степень разделения между пиками ацетонитрила и метиленхлорида; хроматографическая система пригодна, если полученная хроматограмма имеет вид хроматограммы, представленной на Рис. 2.4.24.-2, а степень разделения между пиками ацетонитрила и метиленхлорида - не менее 1,0.

Выполнение измерений в системе А:

- вводят 1 мл равновесной газовой фазы испытуемого раствора в колонку. Если на полученной хроматограмме не обнаруживаются пики, соответствующие пикам остаточных растворителей на хроматограммах, полученных для растворов сравнения (а) или (b), то анализируемый образец выдерживает испытания. Если какой-либо пик на полученной хроматограмме испытуемого раствора соответствует одному из пиков остаточных растворителей на хроматограммах, полученных для растворов сравнения (а) или (b), то должна быть применена система В.

Проверка пригодности хроматографической системы В

Хроматографическая система В считается пригодной, если выполняются следующие условия:

- вводят 1 мл равновесной газовой фазы раствора сравнения (a_1) в колонку и записывают хроматограмму в таких условиях, чтобы можно было замерить соотношение сигнал/шум для бензола; отношение сигнал/шум должно не менее 5 (типовая хроматограмма представлена на Рис.2.4.24.-3).

- вводят 1 мл равновесной газовой фазы раствора сравнения (а) в колонку; пики, соответствующие остаточным растворителям класса 1 должны обнаруживаться;

- вводят 1 мл равновесной газовой фазы раствора сравнения (б) в колонку и записывают хроматограмму в таких условия, чтобы можно было определить степень разделения между пиками ацетонитрила и трихлорэтилена; система пригодна, если полученная хроматограмма имеет вид хроматограмы, представленной на Рис. 2.4.24.-4, а степень разделения пиков ацетонитрила и трихлорэтилена - не менее 1,0.

Выполнение измерений в системе В

Вводят 1 мл равновесной газовой фазы испытуемого раствора в колонку. Если на полученной хроматограмме не обнаруживаются пики, соответствующие пикам остаточных растворителей на хроматограммах, полученных с растворами сравнения (а) или (б), то анализируемый образец выдерживает испытания. Если какой-либо пик на полученной хроматограмме испытуемого раствора соответствует одному из пиков остаточных растворителей на хроматограммах, полученных для растворов сравнения (а) или (b), и подтверждает соответствие, полученное при использовании системы А, то далее поступают следующим образом.

Подтверждение предела содержания остаточных растворителей класса 1 или класса 2

Вводят 1мл равновесной газовой фазы над раствором сравнения (с) в колонку, в условиях, указанных для системы А или системы В, при этом высота пика, соответствующего устанавливаемому остаточному растворителю должна быть не менее 50% шкалы регистрирующего устройства.

Вводят 1мл равновесной газовой фазы над раствором сравнения (d) в колонку. Не должно наблюдаться никаких мешающих пиков.

1 мл равновесной газовой фазы испытуемого раствора и 1 мл газовой фазы над раствором сравнения (с) вводят в колонку не менее трех раз.

Средняя площадь пика остаточного растворителя/растворителей на хроматограмме равновесной газовой фазы над испытуемым раствором не должна быть больше половины площади пика остаточного растворителя/растворителей на хроматограмме равновесной газовой фазы раствора сравнения (с). Хроматографическая система считается пригодной, если относительное стандартное отклонение разностей площадей пиков анализируемого вещества, полученное из трех повторных парных введений равновесной газовой фазы над раствором сравнения (а) и испытуемым раствором, не превышает 15%.

Схема проведения испытаний представлена на Рис. 2.4.24.-5.

Если уровень содержания остаточного растворителя (классов 2 или 3) составляет 0,1% и более, для его количественного определения может быть использован метод стандартных добавок.

Для контроля остаточных растворителей могут быть использованы также и другие валидированные методики.

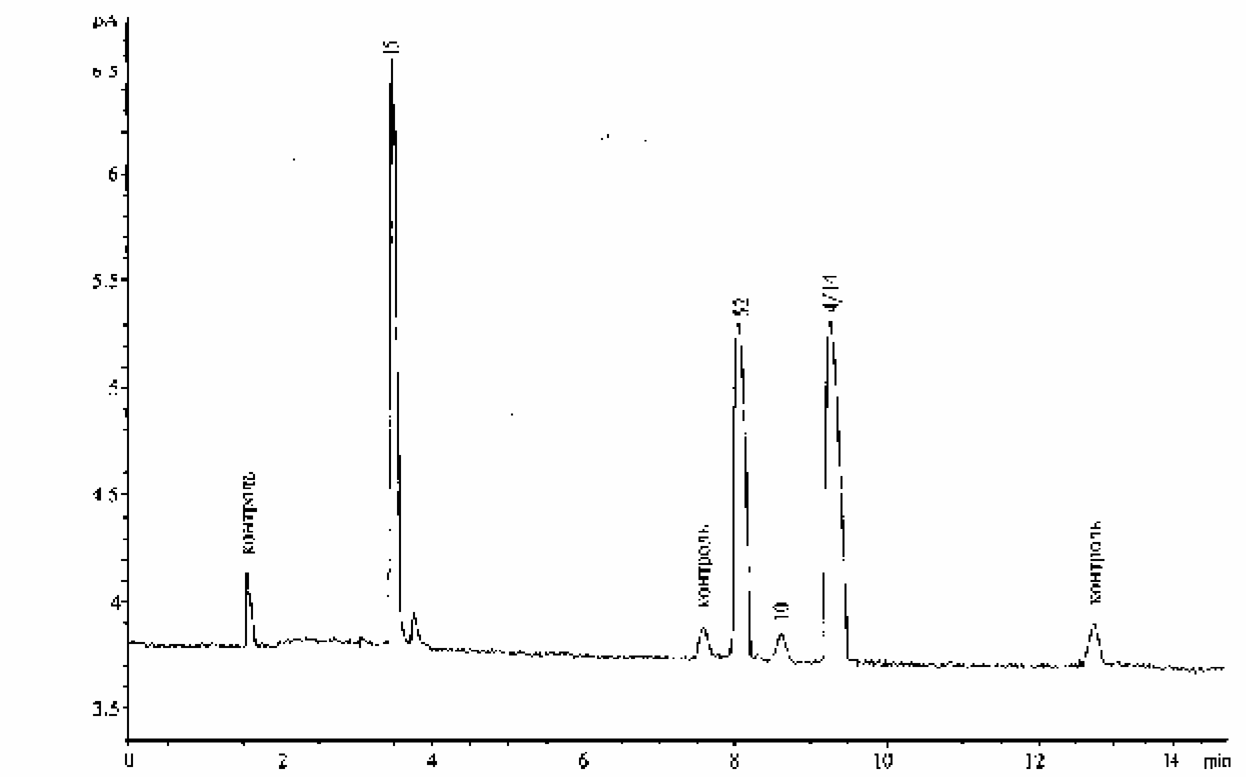


Рисунок 2.4.24.-1. Типичная хроматограмма остаточных растворителей класса 1 в условиях, описанных для системы А и пробоподготовки 1. Пламенно-ионизационный детектор.
4.бензол;**10.**четыреххлористый углерод;**14.**1,2-дихлорэтан;**15.**1,1-дихлорэтен;**52.** 1,1,1-трихлорэтан.

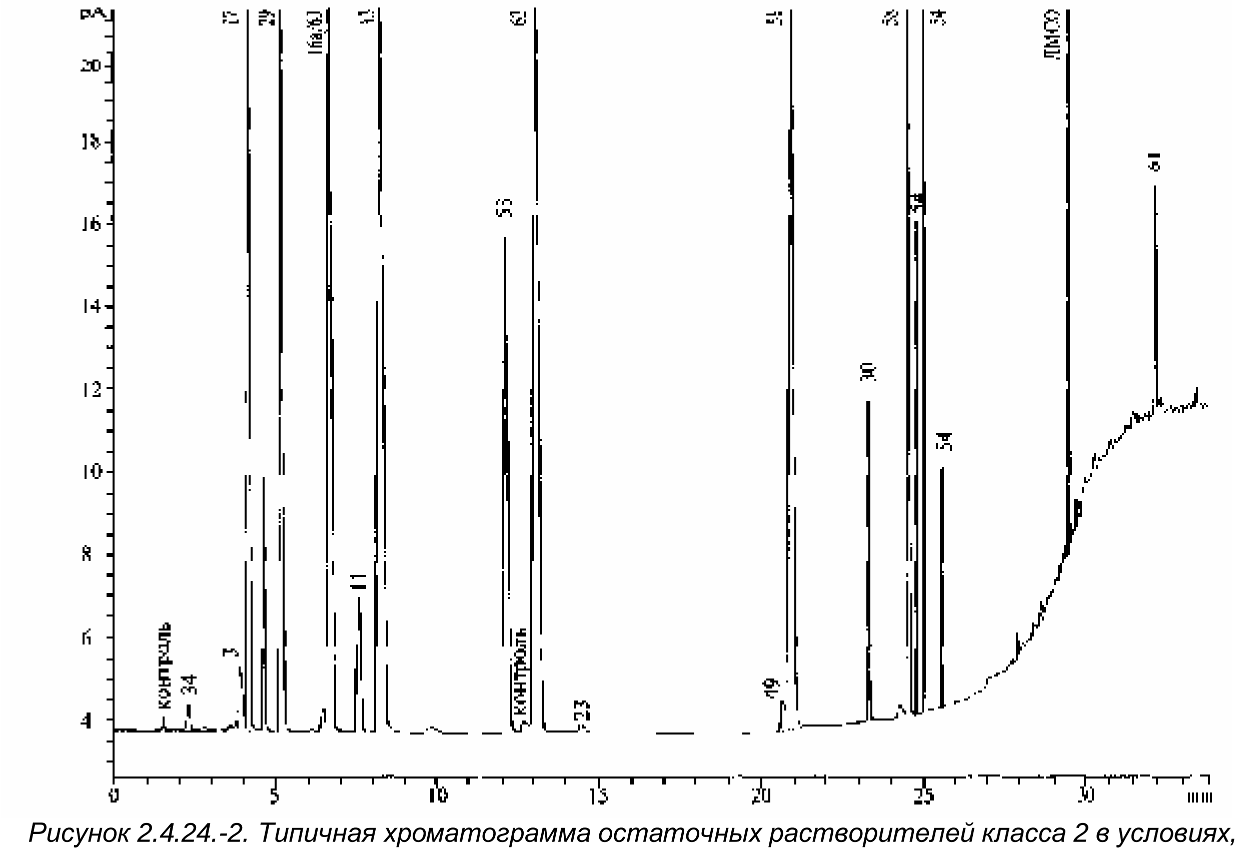


Рисунок 2.4.24.-2. Типичная хроматограмма остаточных растворителей класса 2 в условиях, описанных для системы А и пробоподготовки 1. Пламенно-ионизационный детектор.
3.ацетонитрил; **11.**хлороформ; **13.**циклогексан; **16a.***цис*-1,2-дихлорэтен;**17.**дихлорметан;**29.**гексан; **30**.метилбутилкетон; **34.**метанол; **49.** пиридин; **51.**толуол; **53.**1,1,2-трихлорэтен; **54.***орто*-, *мета*- и *пара*-ксилолы; **58.** хлорбензол; **61.** тетралин; **62.** метилциклогексан; **63.** нитрометан; **64.** 1,2-диметоксиэтан.

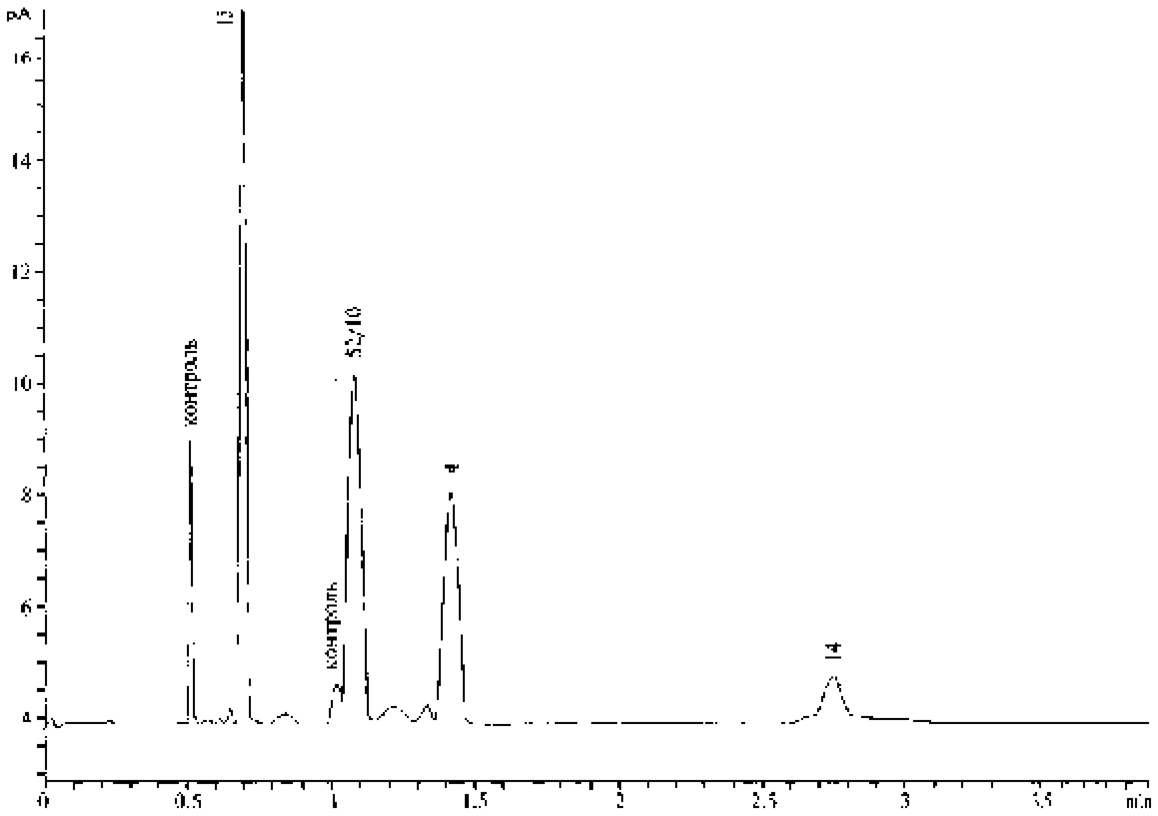


Рисунок 2.4.24.-3. Типичная хроматограмма остаточных растворителей класса 1 в условиях, описанных для системы В и пробоподготовки 1. Пламенно-ионизационный детектор.

4.бензол; **10.**четыреххлористый углерод;**14.**1,2-дихлорэтан;**15.**1,1-дихлорэтен;**52.**1,1,1-трихлорэтан.

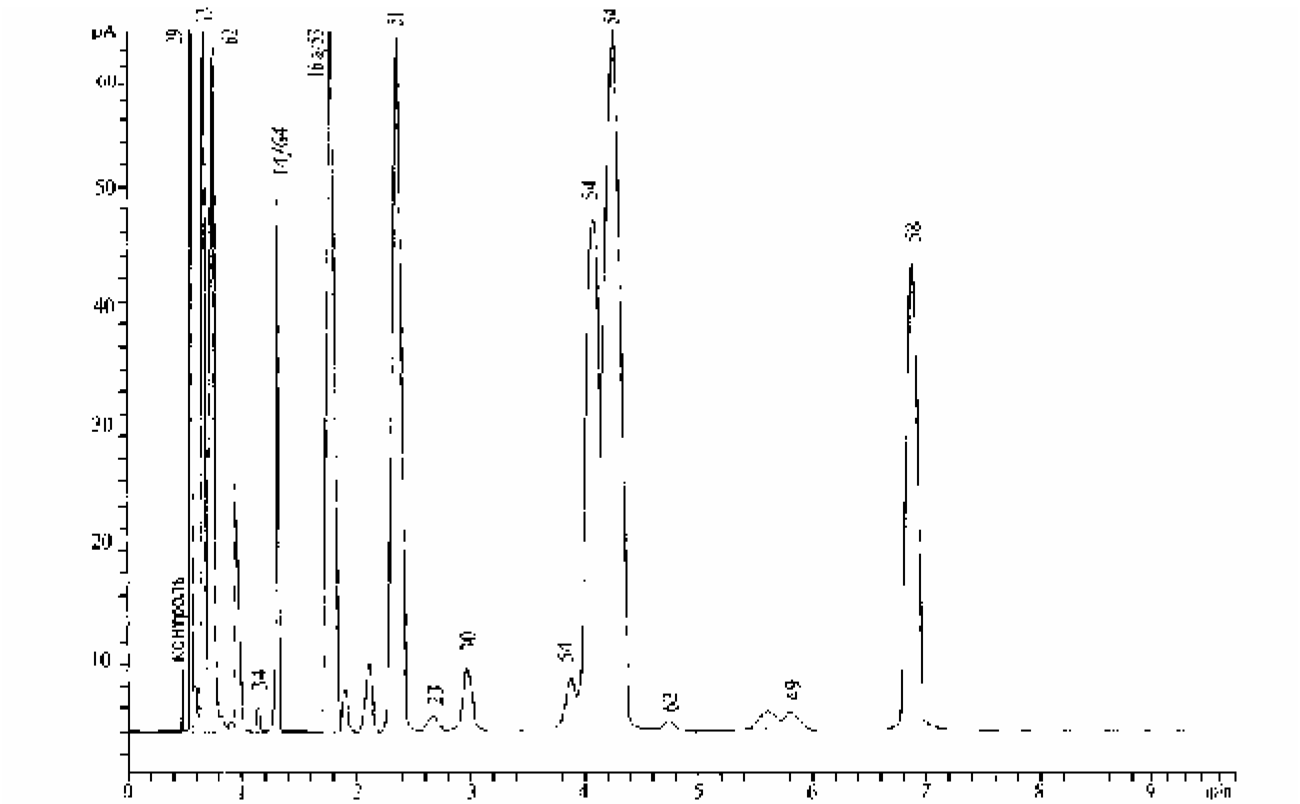


Рисунок 2.4.24.-4. Типичная хроматограмма остаточных растворителей класса 2 в условиях, описанных для системы В и пробоподготовки 1. Пламенно-ионизационный детектор.

3. ацетонитрил; **11.** хлороформ; **13.** циклогексан; **16а.** *цис*-1,2-дихлорэтилен; **17.** дихлорметан; **23.** 1,4-диоксан; **29.** гексан; **30**. метилбутилкетон; **34.** метанол; **49.** пиридин; **51.** толуол; **53.** 1,1,2-трихлорэтен; **54.** *орто*-, *мета*- и *пара*-ксилолы; **58.** хлорбензол; **61.** тетралин; **62.** метилциклогексан; **63.** нитрометан; **64.** 1,2-диметоксиэтан.

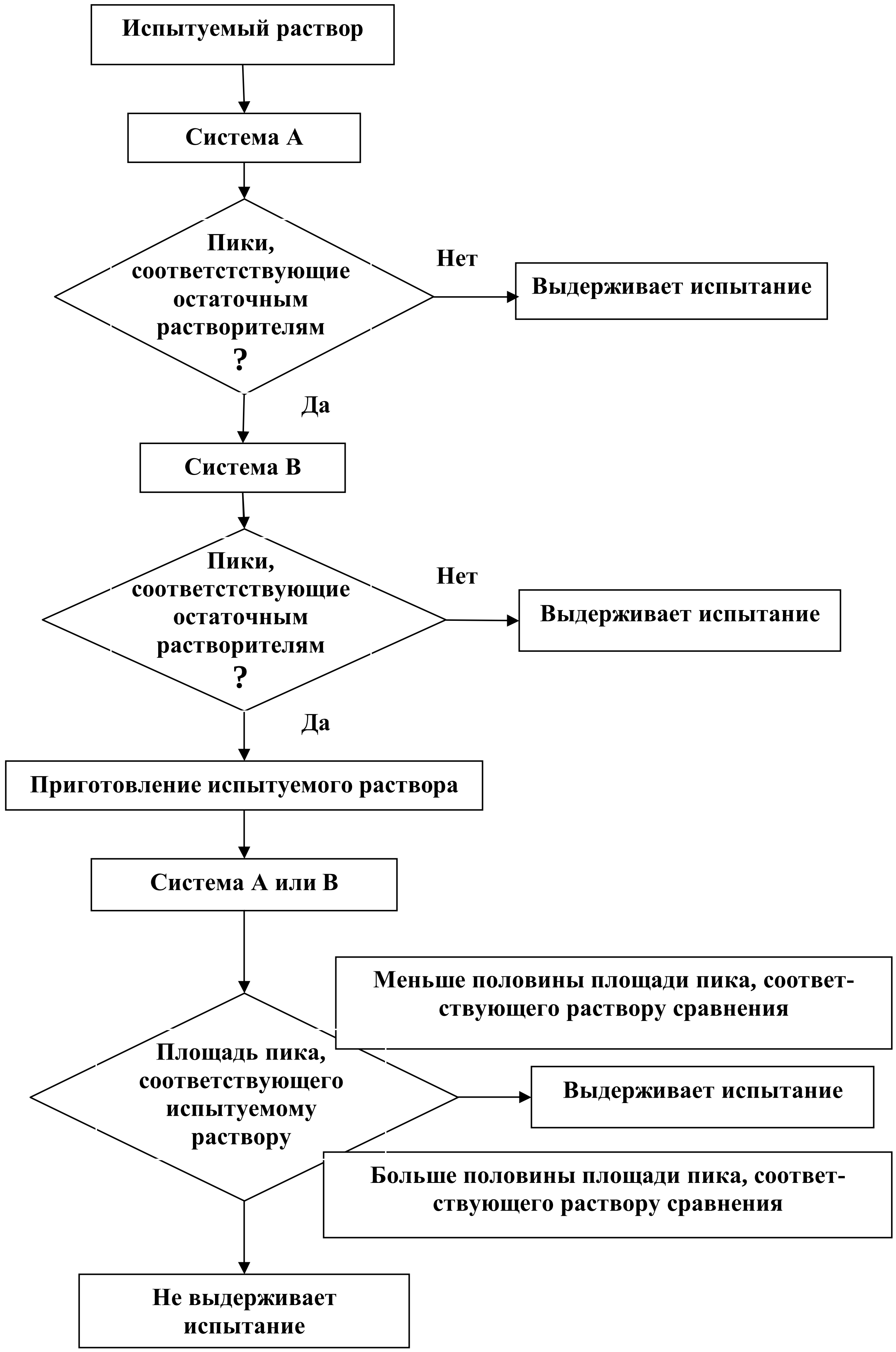


Рисунок 2.4.24.-5.Ход испытаний при идентификации и определении пределов

2.4.25. ОСТАТОЧНЫЕ КОЛИЧЕСТВА ЭТИЛЕНОКСИДА И ДИОКСАНА

Испытание предназначено для определения содержания остаточных количеств этиленоксида и диоксана в веществах, растворимых в воде или диметилацетамиде. Для веществ, нерастворимых или недостаточно растворимых в этих растворителях, приготовление раствора испытуемого вещества и условия определения методом парофазной газовой хроматографии указывают в частной статье.

Испытание проводят методом парофазной газовой хроматографии *(2.2.28).*

А. Для веществ, растворимых или смешивающихся с водой, применяют следующую методику.

Испытуемый раствор. 1,00 г испытуемого образца помещают в контейнер вместимостью 10 мл (в зависимости от условий проведения испытания могут применяться контейнеры другого объема) и прибавляют 1 мл *воды Р.* Контейнер закрывают, содержимое перемешивают до получения однородного раствора и выдерживают в течение 45 мин при температуре 70°С.

Раствор сравнения (a). 1,00 г испытуемого образца помещают в такой же контейнер вместимостью 10 мл, прибавляют 0,50 мл *раствора этиленоксида Р3* и 0,50 мл *раствора диоксана Р1.* Контейнер закрывают, содержимое перемешивают до получения однородного раствора и выдерживают в течение 45 мин при температуре 70 °С.

Раствор сравнения (b). 0,50 мл *раствора этиленоксида Р3* помещают в контейнер вместимостью 10 мл, прибавляют 0,1 мл свежеприготовленного раствора 10 мг/л *ацетальдегида Р* и 0,1 мл *раствора диоксана Р1.* Контейнер закрывают, содержимое перемешивают до получения однородного раствора и выдерживают в течение 45 мин при температуре 70°С.

Б. Для веществ, растворимых или смешивающихся с диметилацетамидом, применяют следующую методику.

Испытуемый раствор. 1,00 г испытуемого образца помещают в контейнер вместимостью 10 мл (в зависимости от условий проведения испытания могут применяться контейнеры другого объема), прибавляют 1 мл *диметилацетамида Р* и 0,20 мл *воды Р*. Контейнер закрывают, содержимое перемешивают до получения однородного раствора и выдерживают в течение 45 мин при температуре 90°С.

Раствор сравнения (a). 1,00 г испытуемого образца помещают в контейнер вместимостью 10 мл и прибавляют 1.0 мл *диметилацетамида Р,* 0,10 мл *раствора диоксана Р* и 0,10мл *раствора этиленоксида Р2.* Контейнер закрывают, содержимое перемешивают до получения однородного раствора и выдерживают в течение 45 мин при температуре 90°С.

Раствор сравнения (b). 0,10 мл *раствора этиленоксида Р2* помещают в контейнер вместимостью 10 мл, прибавляют 0,1 мл свежеприготовленного раствора 10 мг/л *ацетальдегида Р* и 0,1 мл *раствора диоксана Р.* Контейнер закрывают, содержимое перемешивают до получения однородного раствора и выдерживают в течение 45 мин при температуре 90°С.

Могут быть использованы следующие условия подготовки и ввода равновесной паровой фазы:

- температура уравновешивания - 70°С (90°С для растворов в диметилацетамиде);
- время уравновешивания - 45 мин;

- температура блока ввода газовой пробы - 75°C (150°C для растворов в диметилацетамиде);
- газ-носитель - *гелий для хроматографии Р;*
- время подачи газа-носителя в контейнер с анализируемой пробой - 1 мин;
- время ввода газовой пробы - 12 с.

Хроматографируют на газовом хроматографе с пламенно-ионизационным детектором в следующих условиях:
- колонка капиллярная стеклянная или кварцевая длиной 30 м и внутренним диаметром 0,32 мм, внутренняя поверхность которой покрыта слоем *полидиметилсилоксана Р* толщиной 1,0 мкм;
- газ-носитель - *гелий для хроматографии Р* или *азот для хроматографии Р;*
- линейная скорость газа-носителя - около 20 см/с;
- деление потока - 1:20;
- поддерживают температуру колонки 50°C в течение 5 мин, затем повышают до 180°C со скоростью 5°C/мин, затем – до температуры 230°C со скоростью 30°C/мин и поддерживают такую температуру в течение 5 мин;
- температура инжектора - 150°C;
- температура детектора - 250°C.

Хроматографируют подходящий объем, например, 1,0 мл, пробы газовой фазы над раствором сравнения (b). Чувствительность системы регулируют таким образом, чтобы высоты пиков этиленоксида и ацетальдегида на полученной хроматограмме составляли не менее 15% всей шкалы регистрирующего устройства.

Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:
- коэффициент разделения пиков ацетальдегида и этиленоксида составляет не менее 2,0;
- отношение сигнал/шум для пика диоксана составляет не менее 5.

Хроматографируют поочередно подходящие объемы, например, по 1,0 мл (или такой же объем, как для раствора сравнения (b)), проб газовых фаз над испытуемым раствором и раствором сравнения (a), получая по три хроматограммы для каждой из проб. Величины площадей пиков этиленоксида и диоксана на хроматограмме испытуемого раствора должны составлять не более половины величин площадей соответствующих пиков на хроматограмме раствора сравнения (a) (1 ppm этиленоксида и 50 ppm диоксана).

ПРОВЕРКА ТОЧНОСТИ

Для каждой пары введений вычисляют разность площадей пиков этиленоксида и диоксана на хроматограмме раствора сравнения (a) и на хроматограмме испытуемого раствора.

Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:
- относительное стандартное отклонение, рассчитанное для трех значений разности площадей пиков этиленоксида, составляет не более 15%;
- относительное стандартное отклонение, рассчитанное для трех значений разности площадей пиков диоксана, составляет не более 10%.

Если навески испытуемого вещества, взятые для приготовления испытуемого раствора и раствора сравнения (a), отличались от 1.00 г более чем на 0,5%, необходимо внести соответствующие поправки.

Содержание этиленоксида в миллионных частях (ppm) вычисляют по формуле:

$$C = \frac{A_T \cdot C}{(A_R \cdot M_T) - (A_T \cdot M_T)}$$

где:

C — содержание этиленоксида;

A_T — площадь пика этиленоксида на хроматограмме испытуемого раствора;

A_R — площадь пика этиленоксида на хроматограмме раствора сравнения (а);

M_T — масса навески испытуемого вещества, взятая для приготовления испытуемого раствора, в граммах;

M_R — масса навески испытуемого вещества, взятая для приготовления раствора сравнения, в граммах;

С - количество этиленоксида, прибавленного к раствору сравнения (а), в микрограммах.

Содержание диоксана в миллионных частях (ppm) вычисляют по формуле:

$$C = \frac{D_T \cdot C}{(D_R \cdot M_T) - (D_T \cdot M_R)}$$

где:

С — содержание диоксана;

D_T — площадь пика диоксана на хроматограмме испытуемого раствора;

D_R — площадь пика диоксана на хроматограмме раствора сравнения (а);

С — количество диоксана, прибавленного к раствору сравнения (а), в микрограммах.

2.4.26. N,N-ДИМЕТИЛАНИЛИН

МЕТОД А

Испытание проводят методом *газовой хроматографии (2.2.28),* используя в качестве внутреннего стандарта *N,N -диэтиланилин Р.*

Раствор внутреннего стандарта. 50 мг *N,N-диэтиланилина Р* растворяют в 4 мл *0,1 М раствора кислоты хлористоводородной* и доводят объем раствора *водой Р* до 50 мл. 1 мл полученного раствора разводят *водой Р* до 100 мл.

Испытуемый раствор. В колбу с притертой стеклянной пробкой помещают 0,50 г испытуемого вещества и растворяют в 30,0 мл *воды Р,* затем прибавляют 1,0 мл раствора внутреннего стандарта и термостатируют раствор при температуре от 26°С до 28°С. Прибавляют 1,0 мл *раствора натрия гидроксида концентрированного Р* и перемешивают до полного растворения. Прибавляют 2,0 мл *триметилпентана Р,* встряхивают в течение 2 мин и оставляют до расслоения. Используют верхний слой.

Раствор сравнения. 50,0 мг *N,N-диметиланилина Р* растворяют в 4,0 мл *0,1 М раствора кислоты хлористоводородной* и доводят объем раствора *водой Р* до 50,0 мл. 1,0 мл полученного раствора разводят *водой Р* до 100,0 мл. 1,0 мл этого раствора разводят *водой* Рдо 30,0 мл. Прибавляют 1,0 мл раствора внутреннего стандарта и 1,0 мл *раствора натрия гидроксида концентрированного Р.* Прибавляют 2,0 мл *триметилпентана Р,*

встряхивают в течение 2 мин и оставляют до расслоения. Используют верхний слой.

Попеременно хроматографируют по 1 мкл испытуемого раствора и раствора сравнения на газовом хроматографе с пламенно-ионизационным детектором в следующих условиях:

- капиллярная кварцевая колонка длиной 25 м и внутренним диаметром 0,32 мм, внутренняя поверхность которой покрыта слоем модифицированного *полиметилфенилсилоксана Р* толщиной 0,52 мкм;
- газ-носитель - *гелий для хроматографии Р;*
- деление потока - 1:20;
- давление на входе в колонку - 50 кПа;
- объемная скорость сбрасываемого газа-носителя - 20 мл/мин;
- кварцевая вставка испаритель, заполненная слоем *диатомита для газовой хроматографии Р с* нанесенным *поли(диметил)силоксаном Р* в количестве 10% (м/м) толщиной 1 см;
- поддерживают температуру колонки 150°С в течение 5 мин, затем температуру повышают до 275°С со скоростью 20°С в мин и поддерживают такую температуру в течение 3 мин;
- температура инжектора - 220°С;
- температура детектора - 300°С.

Время удерживания *N,N-диметиланилина Р* составляет около 3,6 мин, *N,N-диэтиланилина Р* - около 5,0 мин.

МЕТОД В

Испытание проводят методом *газовой хроматографии* (2.2.28), используя в качестве внутреннего стандарта *нафталин Р.*

Раствор внутреннего стандарта. 50 мг *нафталина Р* растворяют в *циклогексане Р* и доводят объем раствора этим же растворителем до 50 мл. 5 мл полученного раствора разводят *циклогексаном Р* до 100 мл.

Испытуемый раствор. В пробирку с притертой стеклянной пробкой помещают 1,00 г испытуемого вещества, прибавляют 5 мл *1 М раствора натрия гидроксида* и 1,0 мл раствора внутреннего стандарта. Пробирку закрывают и энергично встряхивают в течение 1 мин. При необходимости центрифугируют и используют верхний слой.

Раствор сравнения. К 50,0 мг *N,N-диметиланилина Р* прибавляют 2 мл *кислоты хлористоводородной Р* и 20 мл *воды Р*. Встряхивают до растворения и доводят объем раствора *водой Р* до 50 мл. 5 мл полученного раствора разводят *водой Р* до 250,0 мл. 1 мл полученного раствора помещают в пробирку со стеклянной притертой пробкой, прибавляют 5 мл *1 М раствора натрия гидроксида* и 1,0 мл раствора внутреннего стандарта. Пробирку закрывают и энергично встряхивают в течение 1 мин. При необходимости центрифугируют и используют верхний слой.

Хроматографируют по 1 мкл испытуемого раствора и раствора сравнения на газовом хроматографе с пламенно-ионизационным детектором в следующих условиях:

- стеклянная колонка длиной 2 м и внутренним диаметром 2 мм, заполненная *диатомитом силанизированным для газовой хроматографии Р* с нанесенным в количестве 3% *(м/м) полиметилфенилсилоксаном Р;*
- газ-носитель - *азот для хроматографии Р;*
- скорость газа-носителя - 30 мл/мин;
- температура колонки - 120°С;
- температура инжектора и детектора - 150°С.

2.4.27. НИКЕЛЬ В ГИДРОГЕНИЗИРОВАННЫХ РАСТИТЕЛЬНЫХ МАСЛАХ

Определение никеля проводят методом *атомно-абсорбционной спектрометрии (2.2.23, метод 1).*

При применении закрытых реакционных сосудов высокого давления и микроволнового лабораторного оборудования необходимо строго придерживаться инструкций по технике безопасности и эксплуатации оборудования, прилагаемых производителем.

Испытуемый раствор. 0,100 г испытуемого образца помещают в подходящий герметичный реакционный сосуд из фторполимера или кварцевого стекла, устойчивый к высокому давлению, прибавляют 6,0 мл *кислоты азотной* Р и 2,0 мл *раствора водорода пероксида концентрированного Р.*

Параллельно с теми же количествами реактивов и в тех же условиях готовят контрольный раствор.

Закрытые сосуды выдерживают в лабораторной микроволновой печи по соответствующей программе, например, в течение 10 мин - при мощности печи 250 Вт; в течение 5 мин - 600 Вт; в течение 6 мин - 400 Вт; в течение 7 мин - 250 Вт. После охлаждения сосуды открывают, их содержимое количественно переносят в мерные колбы вместимостью 25,0 мл, доводят объем растворов *водой Р* до метки и перемешивают.

Калибровочные растворы. К 10,0 мл *эталонного раствора никеля (10 ppm Ni) Р* прибавляют 1,0 мл *кислоты азотной Р,* 2,0 мл *раствора водорода пероксида концентрированного Р* и доводят объем раствора до 20,0 мл *водой Р.* 20 мкл, 50 мкл, 100 мкл и 150 мкл полученного раствора вносят, соответственно, в четыре мерные колбы вместимостью 25,0 мл. В каждую колбу прибавляют 6,0 мл *кислоты азотной Р,* доводят объем растворов *водой Р* до метки и перемешивают. Полученные калибровочные растворы содержат соответственно 4 нг/мл, 10 нг/мл, 20 нг/мл и 30 нг/мл (ppb) никеля.

Холостой раствор. 6,0 мл *кислоты азотной Р* помещают в мерную колбу вместимостью 25,0 мл, доводят объем раствора *водой Р* до метки и перемешивают.

Методика. Готовят смеси одного объема раствора 5,0 г/л *магния нитрата Р* и двух объемов контрольного раствора, испытуемого раствора, калибровочных растворов и нулевого раствора, соответственно. Измеряют поглощение растворов при длине волны 232,0 нм на подходящем атомно-абсорбционном спектрометре с графитовой печью, оснащенном системой компенсации фона Зеемана, пиролитически покрытой трубкой с платформой и лампой с полым никелевым катодом. Температура высушивания должна составлять 100°C в течение 10 с после 10 с разогрева, температура озоления - 1400°C в течение 10 с после 20 с разогрева, температура атомизации - 2500°C в течение 5 с. Нулевую точку прибора устанавливают по контрольному раствору. По полученным показаниям строят калибровочную кривую. По калибровочной кривой определяют концентрации испытуемого и контрольного растворов. В случае, если значение абсорбции испытуемого раствора выходит за пределы калибровочной кривой, раствор разбавляют контрольным раствором (фактор разведения - f).

Содержание Ni в образце, в мкг/г (ppm), вычисляют по формуле

$$X = \frac{c \cdot f}{m \cdot 40}$$

где:

X — содержание 2-этилгексановой кислоты;

c — концентрация испытуемого раствора, найденная из калибровочного графика с учетом контрольного раствора, в нанограммах в миллилитре,

f — фактор разведения,

m — масса навески, взятая для приготовления испытуемого раствора, в граммах.

2.4.28. 2-ЭТИЛГЕКСАНОВАЯ КИСЛОТА

Испытание проводят методом *газовой хроматографии (2.2.28),* используя в качестве внутреннего стандарта *кислоту 3-циклогексилпропионовую Р.*

Раствор внутреннего стандарта. 100 мг *кислоты 3-циклогексилпропионовой Р* растворяют в *циклогексане Р* и доводят объем раствора этим же растворителем до 100,0 мл.

Испытуемый раствор. 0,300 г испытуемого образца растворяют в 4,0 мл раствора *кислоты хлористоводородной Р* (33% об/об). Энергично встряхивают по 1 мин с двумя порциями раствора внутреннего стандарта, по 1,0 мл каждая. Оставляют до расслоения, при необходимости центрифугируют. Для испытания используют объединенные верхние слои.

Раствор сравнения. 75,0 мг *кислоты 2-этилгексановой Р* растворяют в растворе внутреннего стандарта и доводят объем раствора этим же растворителем до 50,0 мл. К 1 мл полученного раствора прибавляют 4 мл раствора *кислоты хлористоводородной Р* (33% об/об) и энергично встряхивают в течение 1 мин. Оставляют до расслоения, при необходимости центрифугируют. К нижнему слою прибавляют 1,0 мл раствора внутреннего стандарта и энергично встряхивают в течение 1 мин. Оставляют до расслоения, при необходимости центрифугируют. Для испытания используют объединенные верхние слои.

Хроматографируют по 1 мкл испытуемого раствора и раствора сравнения на газовом хроматографе с пламенно-ионизационным детектором в следующих условиях:

- капиллярная кварцевая колонка длиной 10 м и внутренним диаметром 0,53 мм, покрытая слоем *макрогола 20 000 2-нитротерефталата Р* толщиной 1,0 мкм;
- газ-носитель - *гелий для хроматографии Р;*
- скорость газа-носителя - 10 мл/мин;
- температура колонки и скорость подъема температуры - по следующей программе:

	Время (мин)	Температура (°С)	Скорость подъема температур	Примечания
Колонка	0-2 2-7.3 7.3-10.3	40 40→200 200	- 30 -	Изотермичес- кий режим Линейный градиент температуры Изотерми-ческий режим
Инжектор		200		
Детектор		300		

Хроматографическая система считается пригодной, если коэффициент разделения пиков 2-этилгексановой кислоты (первый пик) и внутреннего стандарта составляет не менее 2,0.

Содержание 2-этилгексановой кислоты в процентах вычисляют по формуле:

$$\frac{A_T \cdot I_R \cdot m_R \cdot 2}{A_R \cdot I_T \cdot m_T}$$

где:

A_T - площадь пика 2-этилгексановой кислоты на хроматограмме испытуемого раствора;

A_R - площадь пика 2-этилгексановой кислоты на хроматограмме раствора сравнения;

I_T - площадь пика внутреннего стандарта на хроматограмме испытуемого раствора;

I_R - площадь пика внутреннего стандарта на хроматограмме раствора сравнения;

m_T - масса навески испытуемого образца, взятая для приготовления испытуемого раствора, в граммах;

m_R - масса навески 2-этилгексановой кислоты, взятая для приготовления раствора сравнения, в граммах.

2.4.29. ЦИНК

К 10,0 мл раствора испытуемого образца, приготовленного, как указанно в частной статье, прибавляют 2,0. мл *раствора кислоты хлористоводородной Р1* и 0.2 мл *раствора калия ферроцианида Р*.

Параллельно готовят эталон с использованием вместо испытуемого раствора 10 мл эталонного раствора цинк-иона (5 ppm Zn), который готовят путём разведения *водой Р* в 1000 раз *эталонного раствора цинка (5 мг/мл Zn) Р.*

Через 10 мин опалесценция испытуемого раствора не должна превышать опалесценцию эталона.

Примечание. В случае появления в испытуемом растворе синего окрашивания, мешающего нефелометрическому сравнению, следует предварительно отделить железо. Для этого к раствору испытуемого вещества, нагретому до кипения, прибавляют *раствор аммиака разведённый Р1* до появления отчётливого запаха и смесь фильтруют. Объём фильтрата доводят *водой Р* до необходимой концентрации и используют для испытания на цинк по описанной выше методике.

2.4.30. ЛЕГКО ОБУГЛИВАЮЩИЕСЯ ВЕЩЕСТВА

Если в частной статье нет других указаний, количество испытуемого образца, указанное в частной статье (тонко измельчённого, если оно находится в твёрдой фазе), небольшими порциями помещают в пробирку из бесцветного стекла, устойчивого к действию кислоты серной, содержащую указанное в частной статье количество серной кислоты (95,0±0,5%, об/об). Пробирку предварительно промывают *кислотой серной Р*, затем *водой Р* и высушивают.

Смесь перемешивают стеклянной палочкой до полного растворения испытуемого вещества, оставляют на 15 мин, если в частной статье нет других указаний, и сравнивают окраску полученного раствора с окраской указанного в частной статье эталона, помещенного в аналогичную пробирку из бесцветного стекла.

Примечание. Для получения кислоты серной (95..0±0,5%, об/об) *серную кислоту Р* прибавляют к определённому объёму *воды Р*, необходимому для достижения указанной концентрации.

2.5. МЕТОДЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ

2.5.1. КИСЛОТНОЕ ЧИСЛО

Кислотным числом I_A называют массу (в мг) калия гидроксида, необходимую для нейтрализации свободных кислот, содержащихся в 1 г испытуемого вещества.

Около 10,00 г или указанную в частной статье навеску испытуемого вещества (г) растворяют в 50 мл смеси равных объемов *спирта Р* и *эфира Р,* предварительно нейтрализованной *0,1 М раствором калия гидроксида*, если нет других указаний в частной статье, используя в качестве индикатора 0,5 мл *раствора фенолфталеина Р1*.

Если испытуемое вещество в целях консервации было насыщено *углерода диоксидом Р*, перед взвешиванием его выдерживают в выпарительной чашке в течение 24 ч в вакуум-эксикаторе.

Если испытуемое вещество не растворяется в смеси растворителей, к колбе присоединяют обратный холодильник и слегка нагревают на теплой водяной бане при постоянном перемешивании до растворения вещества. Затем прибавляют 0,5 мл *раствора фенолфталеина Р1* и титруют *0,1 М раствором калия гидроксида* до появления розового окрашивания, не исчезающего в течение 15 с.

Если объем *0,1 М раствора калия гидроксида*, требуемый для титрования, менее 2 мл, то соответствующим образом увеличивают массу навески испытуемого вещества или используют разбавленный титрант (в последнем случае вносят соответствующие изменения в формулу расчета).

Кислотное число I_A вычисляют по формуле:

$$I_A = \frac{5{,}610 \cdot V}{m},$$

где:
V – объем *0,1 М раствора калия гидроксида*, израсходованного на титрование, в миллилитрах;
5,610 – масса калия гидроксида, соответствующая 1 мл 0,1 М раствора калия гидроксида, в миллиграммах;
m – масса навески испытуемого вещества, в граммах.

2.5.2. ЭФИРНОЕ ЧИСЛО

Эфирным числом I_E называют массу (в мг) калия гидроксида, необходимую для омыления эфиров, содержащихся в 1 г испытуемого вещества.

Эфирное число I_E определяют по разности между числом омыления и кислотным числом и вычисляют по формуле:

$$I_E = I_S - I_A,$$

где:
I_S – число омыления;
I_A – кислотное число.

2.5.3. ГИДРОКСИЛЬНОЕ ЧИСЛО

Гидроксильным числом I_{OH} называют массу (в мг) калия гидроксида, эквивалентную массе кислоты, связывающейся при ацилировании 1 г испытуемого вещества.

МЕТОД А

Навеску испытуемого вещества, в соответствии с табл. 2.5.3.-1, помещают в круглодонную колбу со шлифом вместимостью 150 мл, если нет других указаний в частной статье. Прибавляют объем *раствора уксусного ангидрида Р1*, указанный в таблице 2.5.3.-1.

Таблица 2.5.3.-1

Предполагаемое значение I_{OH}	Навеска испытуемого вещества,в граммах	Объем раствора уксусного ангидрида Р1, в миллилитрах
10 – 100	2,0	5,0
100 – 150	1,5	5,0
150 – 200	1,0	5,0
200 – 250	0,75	5,0
250 – 300	0,60 или 1,20	5,0 или 10,0
300 – 350	1,0	10,0
350 – 700	0,75	15,0
700 - 950	0,5	15,0

К колбе присоединяют воздушный холодильник, помещают в кипящую водяную баню, поддерживая уровень воды в бане на 2,5 см выше уровня жидкости в колбе, и нагревают в течение 1 ч. Затем через верхний конец воздушного холодильника прибавляют 5 мл *воды Р*. При помутнении к раствору прибавляют *пиридин Р* до полного исчезновения мути, отмечая израсходованный объем. Колбу встряхивают, помещают в кипящую водяную баню на 10 мин. Затем колбу извлекают из водяной бани и охлаждают до комнатной температуры. Воздушный холодильник и стенки колбы промывают 5 мл *спирта Р,* предварительно нейтрализованного *раствором фенолфталеина Р1.* Полученный раствор титруют *0,5 М раствором калия гидроксида спиртовым,* используя в качестве индикатора 0,2 мл *раствора фенолфталеина Р1*.

Параллельно проводят контрольный опыт.

Гидроксильное число I_{OH} вычисляют по формуле:

$$I_{OH} = \frac{28.05 \cdot (V_2 - V_1)}{m} + I_A,$$

где:

V_1 – объем *0,5 М раствора калия гидроксида спиртового*, израсходованного на титрование испытуемого вещества в миллилитрах;

V_2 – объем *0,5 М раствора калия гидроксида спиртового*, израсходованный на титрование в контрольном опыте в миллилитрах;

m – масса навески испытуемого вещества, в граммах;

28,05 – масса калия гидроксида, которая соответствует 1 мл *0,5 М раствора калия гидроксида*, в миллиграммах;

I_A – кислотное число.

МЕТОД В

Навеску испытуемого вещества помещают в сухую коническую колбу с притертой пробкой вместимостью 5 мл и прибавляют 2,0 мл *пропионового ангидрида реактива Р.* Колбу закрывают, осторожно встряхивают до растворения вещества и оставляют на 2 ч, если нет других указаний в частной статье. Затем содержимое колбы помещают в коническую колбу с широким горлом вместимостью

500 мл, в которой содержится 25,0 мл раствора 9 г/л *анилина Р* в *циклогексане Р* и 30 мл *кислоты уксусной ледяной Р.*Полученный раствор перемешивают, оставляют на 5 мин, прибавляют 0,05 мл *раствора кристаллического фиолетового Р* и титруют *0,1 М раствором кислоты хлорной* до появления ярко-зеленого окрашивания.

Параллельно проводят контрольный опыт.

Гидроксильное число I_{OH} вычисляют по формуле:

$$I_{OH} = \frac{5{,}610 \cdot (V_1 - V_2)}{m},$$

где:
V_1 – объем *0,1 М раствора кислоты хлорной*, израсходованной на титрование испытуемого вещества, в миллилитрах;
V_2 – объем *0,1 М раствора кислоты хлорной*, израсходованной на титрование в контрольном опыте, в миллилитрах;
m – масса навески испытуемого вещества в граммах;
5,610 – масса калия гидроксида, которая соответствует 1 мл *0,1 М раствора калия гидроксида*, в миллиграммах.

Количество воды, содержащейся в испытуемом веществе, определяют полумикрометодом (2.5.12).

Пересчет гидроксильного числа I_{OH} проводят по формуле:

I_{OH} = *(найденное значение гидроксильного числа вещества) – 31,1 · у ,*
где:
у – содержание воды в испытуемом веществе, в процентах.

2.5.4. ЙОДНОЕ ЧИСЛО

Йодным числом I_i называют массу (в г) галогена в пересчете на йод, которое может связаться со 100 г испытуемого вещества в описанных условиях.

Метод А

Если нет указаний в частной статье, используют метод А. Замена метода А методом В требует проведения валидации.

Навеску вещества (в соответствии с Табл. 2.5.4.-1, если нет других указаний в частной статье) помещают в колбу с притертой пробкой вместимостью 250 мл, предварительно высушенную или промытую *кислотой уксусной ледяной Р,* растворяют в 15 мл *хлороформа Р,* если нет других указаний в частной статье. К полученному раствору медленно прибавляют 25,0 мл *раствора йода бромида Р.*

Таблица 2.5.4.-1

Предполагаемое значение I_i	Масса навески вещества, в граммах
менее 20	1,0
от 20 до 60	от 0,5 до 0,25
от 60 до 100	от 0,25 до 0,15
более 100	от 0,15 до 0,10

Колбу закрывают пробкой и выдерживают в темном месте при частом перемешивании в течение 30 мин, если нет других указаний в частной статье. Прибавляют 10 мл раствора 100 г/л *калия йодида Р,* 100 мл *воды Р* и титруют *0,1 М раствором натрия тиосульфата* при интенсивном перемешивании до светло-желтой окраски, затем прибавляют 5 мл *раствора крахмала Р* и титруют *0,1 М раствором натрия тиосульфата* по каплям до обесцвечивания.

Параллельно проводят контрольный опыт.

Йодное число I_I вычисляют по формуле:

$$I_I = \frac{1{,}269 \cdot (V_2 - V_1)}{m},$$

где:
V_1 – объем *0,1 М раствора натрия тиосульфата,* израсходованный на титрование испытуемого вещества, в миллилитрах;
V_2 – объем *0,1 М раствора натрия тиосульфата,* израсходованный на титрование в контрольном опыте, в миллилитрах;
m — масса навески испытуемого вещества, в граммах.

Метод В

Масса испытуемого вещества должна быть такая, что избыток добавленного *раствора йода хлорида Р* должен составлять 50 - 60 % от общего количества, т.е. 100 - 150 % от связанного количества.

Навеску испытуемого вещества (в соответствии с Табл. 2.5.4.-2, если нет других указаний в частной статье) помещают в колбу с притертой пробкой вместимостью 250 мл, предварительно высушенную или промытую *кислотой уксусной ледяной Р,* растворяют в 15 мл смеси равных объемов *циклогексана Р – кислота уксусная ледяная Р,* если нет других указаний в частной статье. Если необходимо, вещество

Таблица 2.5.4.-2

Предполагаемое значение I_I	Масса (г) испытуемого вещества, (соответствующая избытку 150 % ICl)	Масса (г) испытуемого вещества, (соответствующая избытку 100 % ICl)	Раствор йода хлорида (мл)
< 3	10	10	25
3	8,4613	10,5760	25
5	5,0770	6,3460	25
10	2,5384	3,1730	20
20	0,8461	1,5865	20
40	0,6346	0,7935	20
60	0,4321	0,5288	20
80	0,3173	0,3966	20
100	0,2538	0,3173	20
120	0,2115	0,2644	20
140	0,1813	0,2266	20
160	0,1587	0,1983	20
180	0,1410	0,1762	20
200	0,1269	0,1586	20

расплавляют перед растворением (точка плавления более 50 °С). Очень медленно добавляют объем *раствора йода хлорида Р,* соответствующий табл. 2.5.4. - 2. Колбу закрывают пробкой и выдерживают в темном месте при частом перемешивании в течение 30 мин, если нет других указаний в частной статье. Прибавляют 10 мл раствора 100 г/л *калия йодида Р,* 50 мл *воды Р* и титруют *0,1 М раствором натрия тиосульфата* при постоянном, интенсивном перемешивании до светло-желтой окраски. Добавляют 5 мл раствора *крахмала Р* и продолжают титрование, добавляя по каплям *0,1 М раствор натрия тиосульфата* до полного обесцвечивания.

Параллельно проводят контрольный опыт.

Йодное число I_I вычисляют по формуле:

$$I_I = \frac{1{,}269 \cdot (V_2 - V_1)}{m},$$

где:

V_1 – объем *0,1 М раствора натрия тиосульфата,* израсходованный на титрование испытуемого вещества, в миллилитрах;

V_2 – объем *0,1 М раствора натрия тиосульфата,* израсходованный на титрование в контрольном опыте, в миллилитрах;

m — масса навески испытуемого вещества, в граммах.

Метод С.

Допускается проводить определение йодного числа по следующей методике.

Навеску испытуемого вещества (в соответствии с Табл. 2.5.4.-3) помещают в сухую колбу с притертой пробкой вместимостью 250 мл, растворяют в 3 мл *хлороформа Р,* если нет других указаний в частных статьях, медленно прибавляют 20,0 мл *раствора йода хлорида* Р (0,1 М).

Колбу закрывают пробкой, смоченной раствором 10 г/л *калия йодида Р,* и выдерживают в темном месте при частом перемешивании в течение 1 ч, если нет других указаний в частной статье. Прибавляют 10 мл раствора 100 г/л *калия йодида Р,* 50 мл *воды Р* и титруют *0,1 М раствором натрия тиосульфата* при постоянном, интенсивном перемешивании до светло-желтой окраски, затем прибавляют 3 мл *хлороформа Р*, интенсивно перемешивают, прибавляют 5 мл *раствора крахмала Р* и титруют *0,1 М раствором натрия тиосульфата* по каплям до обесцвечивания.

Параллельно проводят контрольный опыт.

Таблица 2.5.4.-3

Предполагаемое значение I_i	Масса навески вещества, в граммах
от 0 до 30	от 1,1 до 0,7
от 31 до 50	от 0,7 до 0,5
от 51 до 100	от 0,5 до 0,25
от 101 до 150	от 0,25 до 0,15
более 150	менее 0, 15

При анализе твердых жиров навеску растворяют в 6 мл *эфира Р,* прибавляют 20,0 мл *0,1 М раствора йода хлорида Р.* Дальнейшее определение проводят как указано выше.

2.5.5. ПЕРЕКИСНОЕ (ПЕРОКСИДНОЕ) ЧИСЛО

Перекисным (пероксидным) числом I_p называют количество эквивалентов (в ммоль) активного кислорода, соответствующее количеству пероксидов, содержащееся в 1000 г испытуемого вещества, определяемое методами, приведенными ниже.

Если нет указаний в частной статье, используют метод А. Замена метода А методом Б в этом случае требует проведения валидации.

МЕТОД А

Около 5,00 г испытуемого вещества помещают в коническую колбу с притертой стеклянной пробкой вместимостью 250 мл, прибавляют 30 мл смеси: *хлороформ Р - кислота уксусная ледяная Р* (2:3). Колбу встряхивают до растворения вещества, прибавляют 0,5 мл *насыщенного раствора калия йодида Р,* перемешивают в течение 1 мин и прибавляют 30 мл *воды Р.* Полученный раствор титруют *0,01 М раствором натрия тиосульфата,* медленно добавляя титрованный раствор при непрерывном перемешивании почти до полного исчезновения желтой окраски. Затем прибавляют 5 мл *раствора крахмала Р* и продолжают титровать, интенсивно перемешивая до обесцвечивания раствора.

Параллельно проводят контрольный опыт.

Объем *0,01 М раствора натрия тиосульфата Р,* израсходованный на титрование в контрольном опыте, не должен превышать 0,1 мл.

Пероксидное число рассчитывают по формуле:

$$I_p = \frac{10 \cdot (V_1 - V_2)}{m},$$

где:
V_1 — объем *0,01 М раствора натрия тиосульфата,* израсходованный на титрование испытуемого вещества, в миллилитрах;
V_2 — объем *0,01 М раствора натрия тиосульфата,* израсходованный на титрование в контрольном опыте, в миллилитрах;

m — масса навески испытуемого вещества, в граммах.

МЕТОД B

Испытания проводят в защищенном от света месте.

Навеску испытуемого вещества, в соответствии с таблицей 2.5.5.-1, помещают в коническую колбу с притертой стеклянной пробкой, прибавляют 50 мл смеси: *триметилпентан Р - кислота уксусная ледяная Р* (2:3).

Таблица 2.5.5.-1

Предполагаемое значение пероксидного числа	Масса навески испытуемого вещества, в граммах
от 0 до 12	от 2,00 до 5,00
от 12 до 20	от 1,20 до 2,00
от 20 до 30	от 0,80 до 1,20
от 30 до 50	от 0,500 до 0,800
от 50 до 90	от 0,300 до 0,500

Колбу закрывают пробкой и содержимое перемешивают до растворения вещества. К полученному раствору мерной пипеткой прибавляют 0,5 мл *насыщенного раствора калия йодида Р.* Колбу закрывают пробкой, оставляют на 60 ± 1 с, тщательно встряхивая раствор не менее трех раз, прибавляют 30 мл *воды Р* и титруют *0,1 М раствором натрия тиосульфата,* добавляя титрованный раствор постепенно при постоянном и интенсивном перемешивании почти до полного исчезновения желтой окраски йода. Затем прибавляют около 0,5 мл *раствора крахмала Р1* и продолжают титрование при постоянном интенсивном перемешивании вблизи точки эквивалентности с целью полного высвобождения йода из слоя органического растворителя. Раствор натрия тиосульфата прибавляют по каплям, до исчезновения синей окраски.

Если объем *0,1 М раствора натрия тиосульфата,* израсходованный на титрование, менее 0,5 мл, определение повторяют с *0,01 М раствором натрия тиосульфата* при постоянном и интенсивном перемешивании.

Примечание: Для пероксидных чисел около 70 и более наблюдается задержка обесцвечивания индикатора крахмала от 15 с до 30 с, что обусловлено способностью триметилпентана всплывать на поверхность водной фазы. Поэтому необходимо время для смешивания растворителя с титрованным раствором для полного высвобождения йода. Для пероксидных чисел менее 15 рекомендуют использовать *0,01 М раствор натрия тиосульфата.* С целью предотвращения расслоение фаз и быстрого высвобождения йода, к реакционной смеси допускается прибавление небольшого количества (0,5 % - 1 % *(м/м))* эмульгатора с высоким гидрофильно-липофильным балансом (ГЛБ).

Параллельно проводят контрольный опыт.

Если объем титрованного раствора, израсходованный на титрование в контрольном опыте, превышает 0,1 мл, испытание повторяют со свежеприготовленными реактивами.

Пероксидное число I_p рассчитывают по формуле:

$$I_p = \frac{1000 \cdot (V_1 - V_o) \cdot c}{m},$$

где:
c – концентрация раствора натрия тиосульфата, в молях на литр;
V_1 – объем раствора натрия тиосульфата, израсходованный на титрование вещества, в миллилитрах;
V_0 – объем раствора натрия тиосульфата, израсходованный на титрование в контрольном опыте, в миллилитрах;
m – масса навески испытуемого вещества, в граммах.

2.5.6. ЧИСЛО ОМЫЛЕНИЯ

Числом омыления I_S называют массу (в мг) калия гидроксида, необходимую для нейтрализации свободных кислот и омыления сложных эфиров, содержащихся в 1 г испытуемого вещества.

Навеску испытуемого вещества (в соответствии с Табл.2.5.6.-1, если нет других указаний в частной статье) помещают в колбу из боросиликатного стекла вместимостью 250 мл, снабженную обратным холодильником.

Если испытуемое вещество в целях консервации было насыщено углерода диоксидом, перед взвешиванием его выдерживают в выпарительной чашке в течение 24 ч в *вакуум-эксикаторе*.

Таблица 2.5.6.-1

Предполагаемое значение числа омыления	Масса навески испытуемого вещества, в граммах
от 3 до 10	от 12 до 15
от 10 до 40	от 8 до 12
от 40 до 60	от 5 до 8
от 60 до 100	от 3 до 5
от 100 до 200	от 2,5 до 3
от 200 до 300	от 1 до 2
от 300 до 400	от 0,5 до 1

Прибавляют 25,0 мл *0,5 М раствора калия гидроксида спиртового* и несколько стеклянных шариков. К колбе присоединяют обратный холодильник и нагревают на кипящей водяной бане в течение 30 мин, если нет других указаний в частной статье. Прибавляют 1 мл *раствора фенолфталеина Р1* и горячий раствор тотчас титруют *0,5 М раствором кислоты хлористоводородной.*

Параллельно проводят контрольный опыт.

Число омыления I_S вычисляют по формуле:

$$I_S = \frac{28{,}5 \cdot (V_2 - V_1)}{m},$$

где:
V_1 — объем 0,5 *М раствора кислоты хлористоводородной,* израсходованный на титрование испытуемого вещества, в миллилитрах;
V_2 — объем *0,5 М раствора кислоты хлористоводородной,* израсходованный на титрование в контрольном опыте, в миллилитрах;
m – масса навески испытуемого вещества, в граммах;
28,05 – масса калия гидроксида, соответствующая 1 мл *0,5 М раствора кислоты хлористоводородной,* в миллиграммах.

2.5.7. НЕОМЫЛЯЕМЫЕ ВЕЩЕСТВА

Термин «Неомыляемые вещества» применяется к веществам, нелетучим при температуре от 100°C до 105°C, которые экстрагируются органическим растворителем из испытуемого вещества после его омыления. Содержание неомыляемых веществ вычисляют в процентах (*м/м*).

Следует использовать стеклянную посуду со шлифами без смазки.

Навеску испытуемого вещества (m, г), указанную в частной статье, помещают в колбу вместимостью 250 мл, снабженную обратном холодильником. Прибавляют 50 мл *2 М раствора калия гидроксида спиртового Р* и нагревают на водяной бане в течение 1 ч, периодически перемешивая круговыми движениями. Затем охлаждают до температуры ниже 25°C и количественно переносят содержимое колбы в делительную воронку с помощью 100 мл *воды Р.* Полученный раствор осторожно встряхивают с тремя порциями *эфира, свободного от пероксидов, Р* по 100 мл каждая. Все эфирные извлечения собирают в отдельную делительную воронку, в которую предварительно помещают 40 мл *воды Р*, осторожно встряхивают в течение нескольких минут, позволяют смеси полностью расслоиться, после чего отбрасывают водный слой. Эфирный слой промывают двумя порциями *воды Р*, по 40 мл каждая. Затем тщательно промывают поочередно 40 мл 30 г/л раствора *калия гидроксида Р* и 40 мл *воды Р*; повторяют данную процедуру три раза. Затем эфирный слой несколько раз промывают 40 мл *воды Р*, до отсутствия щелочной реакции в водном слое по фенолфталеину. Эфирный слой количественно переносят в доведенную до постоянной массы колбу с помощью *эфира, свободного от пероксидов Р.*

Эфир отгоняют с соответствующими предосторожностями и к остатку прибавляют 6 мл *ацетона Р*. Затем аккуратно удаляют растворитель в потоке воздуха. Остаток в колбе сушат до постоянной массы при температуре от 100°C до 105°C, охлаждают в эксикаторе и взвешивают (a, г).

Содержание неомыляемых веществ вычисляют по формуле:

$$Неомыляемые\ \ вещества = \frac{100 \cdot a}{m}\%,$$

где:
a – масса остатка, г;
m – масса испытуемого вещества, г.

Остаток растворяют в 20 мл *спирта Р*, предварительно нейтрализованного по *раствору фенолфталеина Р*, и титруют *0,1 М раствором натрия гидроксида спиртовым.* Если объем *0,1 М раствора натрия гидроксида спиртового*, пошедшего на титрование, более 0,2 мл, расслоение слоев прошло не полностью; при этом взвешенный остаток не может рассматриваться как «Неомыляемые вещества». В этом случае испытания необходимо повторить.

2.5.8. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИННОГО АЗОТА В СОЕДИНЕНИЯХ, КОТОРЫЕ СОДЕРЖАТ ПЕРВИЧНУЮ АРОМАТИЧЕСКУЮ АМИНОГРУППУ

Нитритометрическое титрование применяют для количественного определения соединений, содержащих первичную или вторичную ароматическую

аминогруппу, для определения гидразидов, а также ароматических нитросоединений после предварительного восстановления нитрогруппы до аминогруппы.

Растворяют указанное количество испытуемого вещества в 50 мл *кислоты хлористоводородной разбавленной Р* или в другом указанном растворителе и прибавляют 3 г *калия бромида Р*. Охлаждают в воде со льдом и затем медленно титруют, при постоянном перемешивании, *0,1 М раствором натрия нитрита* поддерживая температуру раствора около 15°С, если нет других указаний в частной статье.

Перед началом титрования прибавляют *0,1 М раствор натрия нитрита* со скоростью 2 мл/мин. К концу титрования (приблизительно за 0,5 мл до эквивалентного количества) скорость титрования уменьшают до 0,05 мл/мин.

Конечную точку титрования определяют электрометрическими методами (*2.2.19* или *2.2.20*) или с помощью внутренних индикаторов, или внешнего индикатора.

При потенциометрическом титровании в качестве индикаторного электрода применяют платиновый электрод, электродом сравнения служит хлоридсеребряный или насыщенный каломельный электрод.

В качестве внешнего индикатора используют йодкрахмальную бумагу. Титрование проводят, пока через 1 мин, если нет других указаний в частной статье, после прибавления *0,1 М раствора натрия нитрита* капля титруемого раствора, взятая с помощью стеклянной палочки, не будет вызывать синее окрашивание бумаги. Параллельно проводят контрольный опыт.

В качестве внутренних индикаторов используют тропеолин 00 (0,2 мл *раствора тропеолина 00 Р*), тропеолин в смеси с метиленовым синим (0,2 мл *раствора тропеолина 00 Р* и 0,1 мл *раствора метиленового синего Р*) или раствор нейтрального красного 5 г/л (0,1 мл раствора в начале титрования и 0,1 мл в конце титрования). Титрование с тропеолином 00 проводят до перехода окраски от красной к желтой, со смесью тропеолина 00 с метиленовым синим – от красно-фиолетовой к голубой, с нейтральным красным – от красно-фиолетовой к синей. Выдержку в конце титрования с нейтральным красным увеличивают до 2 мин.

2.5.9. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АЗОТА ПОСЛЕ МИНЕРАЛИЗАЦИИ СЕРНОЙ КИСЛОТОЙ

Прибор для определения азота (Рис. 2.5.9.-1) состоит из парообразователя *1* с предохранительной трубкой *2*, сменных грушевидных колб с длинным горлом *3*, воронки для ввода раствора натрия гидроксида *4* с зажимом или краном *5*, брызгоуловителя *6*, прямого холодильника *7* и сменных конических колб – приемников *8*. В случае применения прибора, в котором для соединения отдельных частей используются резиновые трубки и пробки, перед первым употреблением их необходимо прокипятить в течение 10 мин в 5% растворе *натрия гидроксида* и тщательно промыть *водой Р*.

ПОЛУМИКРОМЕТОД

Указанную массу испытуемого вещества (*m*, г), содержащего около 2 мг азота, помещают в колбу для сжигания, прибавляют 4 г измельченной смеси, состоящей из 100 г *калия сульфата Р*, 5 г *меди сульфата Р* и 2,5 г *селена Р*, и три стеклянных шарика. Смывают прилипшие к горлу колбы частицы 5 мл *кислоты серной Р*, таким образом, чтобы кислота стекала по стенкам колбы. Содержимое колбы

перемешивают круговыми движениями. Во избежание чрезмерных потерь серной кислоты горло колбы неплотно закрывают пробкой (например, подходящей грушевидной пробкой с коротким отростком). Колбу нагревают, постепенно доводя до кипения с конденсацией серной кислоты в горле колбы; при этом необходимо следить за тем, чтобы верхняя часть колбы не перегревалась. Нагревание продолжают в течение 30 мин, если нет других указаний в частной статье. Охлаждают, растворяют твердый остаток, осторожно прибавляя к смеси 25 мл *воды Р*, опять охлаждают и подсоединяют к прибору для перегонки с водяным паром. Прибавляют 30 мл *раствора натрия гидроксида концентрированного Р* и немедленно перегоняют, пропуская пар через смесь. Собирают около 40 мл отгона в приемник, содержащий 20,0 мл *0,01 М раствора кислоты хлористоводородной* и достаточное количества *воды Р* для того, чтобы конец холодильника был погружен в жидкость. В конце перегонки приемник опускают таким образом, чтобы конец холодильника находился над поверхностью жидкости. Необходимо исключить попадание жидкости на внешнюю поверхность холодильника из содержимого приемника.

По окончании отгонки конец холодильника промывают снаружи небольшим количеством *воды Р*, собирая промывную воду в тот же приемник.

Отгон титруют *0,01 М раствором натрия гидроксида,* используя в качестве индикатора *смешанный раствор метилового красного Р* до перехода окраски из красно-фиолетовой в зеленую (V_1 мл *0,01 М раствора натрия гидроксида*).

Испытания повторяют, используя вместо испытуемого вещества около 50 мг *глюкозы Р*.

$$\textit{Содержание азота} = \frac{0{,}01401 \cdot (V_2 - V_1)}{m}\%,$$

где:
m – масса испытуемого вещества, г;
V_1 – объем *0,01 М раствора натрия гидроксида*, пошедшего на титрование раствора, полученного после сжигания испытуемого вещества, мл;
V_2 – объем *0,01 М раствора натрия гидроксида*, пошедшего на титрование раствора, полученного после сжигания глюкозы, мл.

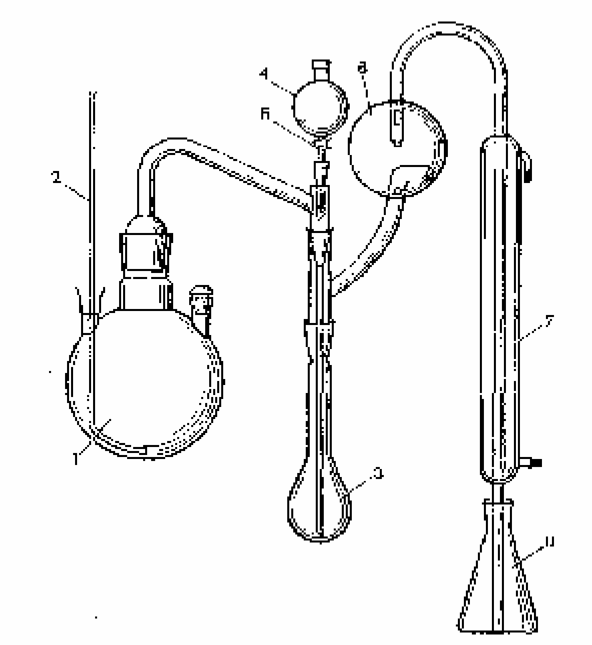


Рис. 2.5.9.-1. Прибор для определения азота

2.5.10. МЕТОД СЖИГАНИЯ В КОЛБЕ С КИСЛОРОДОМ

Сущность метода сжигания органических веществ в колбе с кислородом состоит в разрушении органических веществ сожжением в атмосфере кислорода, дальнейшем растворении образовавшихся продуктов горения в поглощающей жидкости и последующем определении элементов, которые находятся в растворе в виде ионов. Метод обычно используют для определения галогенов (хлора, брома, йода, фтора), серы и фосфора.

Если не указано иное, колба для сжигания это коническая колба вместимостью от 750 мл до 1000 мл из термостойкого стекла со шлифом. В пробку колбы впаяна платиновая проволока диаметром около 0,75 мм с корзиночкой или спиралью на конце (держатель образца) (Рис. 2.5.10.-1), который находится на расстоянии около 2 см от дна колбы. Колба для сжигания должна быть тщательно вымыта и свободна от следов органических веществ и растворителей.

Указанное в частной статье количество мелкоизмельченного вещества помещают в центр фильтровальной бумаги размером от 30 мм до 40 мм с небольшой полосой шириной 10 мм и длиной 30 мм.

Фильтровальную бумагу (Рис. 2.5.10.-2) заворачивают в виде пакетика, оставляя узкую полоску. В случае испытания жидкостей, их помещают в капилляр, запаянный парафином, или в капсулу из полиэтилена, нитропленки или метилцеллюлозы. Для трудно летучих жидкостей возможно применение двойного бумажного пакетика. При испытании мазеподобных веществ применяют капсулу из нитропленки или пакет из вощёной бумаги. Капсулы и капилляры заворачивают в пакетик из фильтровальной бумаги, оставляя узкую полоску. При анализе твердых и мазеобразных соединений, сгорающих со вспышкой, к навеске прибавляют 3-5 мг парафина. Приготовленную пробу помещают в держатель.

Если в частной статье указана бумага, пропитанная лития карбонатом, перед использованием центр бумаги увлажняют *насыщенным раствором лития карбоната Р* и сушат в сушильном шкафу. Испытуемое вещество заворачивают в бумагу и помещают в держатель образца. Помещают в колбу *воду Р* или указанный раствор, предназначенный для поглощения продуктов горения. С помощью трубки, конец которой находится выше уровня жидкости, вытесняют воздух из колбы, пропуская поток кислорода. Смачивают горловину колбы *водой Р,* поджигают узкий конец фильтровальной бумаги с соблюдением мер предосторожности и закрывают колбу пробкой.

Для соблюдения мер предосторожности необходимо: надеть защитные очки, колбу поместить в предохранительный чехол, установить защитный экран.

Во время сжигания необходимо придерживать пробку колбы рукой. После сжигания колбу энергично встряхивают до полного растворения продуктов горения. Колбу охлаждают в течение 5 мин, если нет других указаний, и осторожно открывают. Обмывают дно, стенки колбы и держатель образца *водой Р*. Объединяют продукты горения и жидкость после промывки. Определение проводят методом, указанным в частной статье.

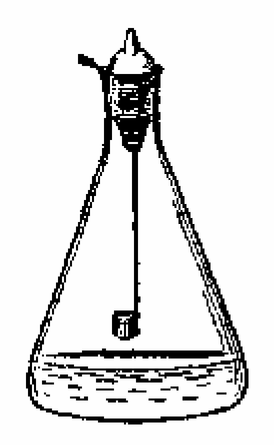


Рис. 2.5.10.-1. Прибор для сжигания в кислороде

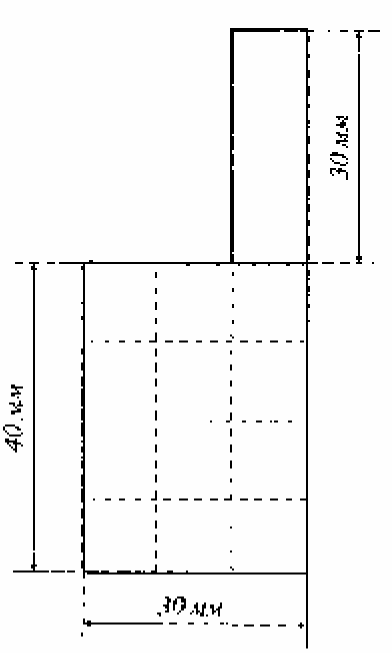


Рис. 2.5.10.-2. Фильтровальная бумага для приготовления пакетика

2.5.11. КОМПЛЕКСОМЕТРИЧЕСКОЕ ТИТРОВАНИЕ

Комлексометрическое титрование – это группа методов титрования, основанных на реакциях образования растворимых в воде комплексных соединений.

Комплексонометрическое титрование как частный случай комплексометрического титрования основано на реакции комплексообразования катионов металлов с комплексонами – аминополикарбоновыми кислотами и их солями. Образующиеся комплексные соединения называют комплексонатами.

Для комплексонометрического титрования в качестве титранта обычно применяют динатриевую соль этилендиаминтетрауксусной кислоты, известную под названиями: натрия эдетат, трилон Б, комплексон III, хелатон III и др.

Натрия эдетат образует с катионами многовалентных металлов устойчивые и хорошо растворимые в воде комплексонаты в стехиометрическом отношении 1:1 и используется для количественного определения алюминия, висмута, кальция, свинца, магния и цинка в лекарственных средствах.

Индикаторы, применяемые для визуального обнаружения конечной точки титрования, называются металлоиндикаторами. Большинство из них (металло хромные индикаторы) являются органическими красителями и обладают свойством изменять окраску при образовании комплексных соединений с катионами металлов. Металлоиндикаторы для комплексонометрии подбирают таким образом, чтобы их взаимодействие с катионами определяемых металлов было обратимым и устойчивость их комплексов была значительно меньше устойчивости комплексонатов, образующихся в процессе титрования.

Прямое титрование растворами натрия эдетата проводят следующим образом: к анализируемому раствору, если необходимо, нейтрализованному, прибавляют буферный раствор для создания требуемого значения pH, затем прибавляют металлоиндикатор. В процессе титрования раствором натрия эдетата в конечной точке титрования окраска раствора изменяется от окраски комплекса

металлоиндикатора с титруемым катионом металла до окраски свободного металлоиндикатора.

При обратном титровании к испытуемому раствору прибавляют натрия эдетат и его избыток оттитровывают при определенном значении pH в присутствии соответствующего металлоиндикатора растворами солей цинка, магния, свинца и др.

Допускается использование в качестве титранта *0,05 М раствор натрия эдетата,* что должно быть указано в частной статье.

АЛЮМИНИЙ

20,0 мл раствора, указанного в частной статье, помещают в коническую колбу вместимостью 500 мл, прибавляют 25,0 мл *0,1 М раствора натрия эдетата* и 10 мл смеси равных объемов раствора 155 г/л *аммония ацетата Р* и *кислоты уксусной разведенной Р*, кипятят в течение 2 мин и затем охлаждают. Прибавляют 50 мл *этанола Р* и 3 мл свежеприготовленного 0,25 г/л раствора *дитизона Р* в *этаноле Р*. Титруют избыток натрия эдетата *0,1 М раствором цинка сульфата* до перехода зеленовато-синей окраски раствора в красно-фиолетовую.

1 мл *0,1 М раствора натрия эдетата* соответствует 2,698 мг Al.

Допускается проводить определение алюминия по следующей методике:

Точную навеску испытуемого вещества, эквивалентную 0,02–0,03 г алюминия, растворяют в 2 мл *1 М раствора кислоты хлористоводородной* и 50 мл *воды Р.* Прибавляют 50 мл *0,05 М раствора натрия эдетата* и нейтрализуют *1 М раствором натрия гидроксида,* используя в качестве индикатора *метиловый красный Р.* Раствор нагревают до кипения и выдерживают на кипящей водяной бане в течение 10 мин, охлаждают, прибавляют 50 мг *индикаторной смеси ксиленолового оранжевого Р, 5 г гексаметилентетрамина Р* и титруют избыток натрия эдетата *0,05 М раствором свинца нитрата* до розовато-фиолетового окрашивания.

1 мл *0,05 М раствора натрия эдетата* соответствует 1,349 мг Al.

ВИСМУТ

Раствор, указанный в частной статье, помещают в коническую колбу вместимостью 500 мл. Доводят объем *водой Р* до 250 мл и затем, если нет других указаний в частной статье, прибавляют по каплям, при перемешивании, *раствор аммиака концентрированный Р* до помутнения смеси. Затем прибавляют 0,5 мл *кислоты азотной Р,* нагревают при температуре около 70°С до полного исчезновения помутнения. Прибавляют около 50 мг *индикаторной смеси ксиленолового оранжевого Р* и титруют 0*,1 М раствором натрия эдетата* до перехода розовато-фиолетовой окраски раствора в желтую.

1 мл *0,1 М раствора натрия эдетата* соответствует 20,90 мг Bi.

КАЛЬЦИЙ

Раствор, указанный в частной статье, помещают в коническую колбу вместимостью 500 мл и доводят объем *водой Р* до 300 мл. Прибавляют 6,0 мл *раствора натрия гидроксида концентрированного Р* и около 15 мг *индикаторной смеси кальконкарбоновой кислоты Р*. Титруют *0,1 М раствором натрия эдетата* до перехода фиолетовой окраски раствора в синюю.

1 мл *0,1 М раствора натрия эдетата* соответствует 4,008 мг Ca.

Допускается проводить определение кальция по следующей методике:

Точную навеску препарата, эквивалентную 0,04-0,05 г кальция, растворяют, как указано в частной статье, в *воде Р* или *кислоте хлористоводородной разбавленной Р*. Доводят объем раствора *водой Р* до 50 мл, прибавляют 10 мл буферного раствора с pH 9,5-10,0; 0,1 г индикаторной смеси хромового темно-синего (0,25 г хромового темно-синего и 25 г натрия хлорида растирают в ступке и перемешивают) или 7 капель раствора хромового темно-синего (0,5 г хромового темно-синего растворяют в 10 мл аммиачного буферного раствора (pH от 9,5 до 10,0) и доводят объем раствора 95 % спиртом до 100 мл, срок годности раствора 1 мес) и титруют *0,05 М раствором натрия эдетата* до сине-фиолетового окрашивания.

1 мл *0,05 М раствора натрия эдетата* соответствует 2,004 мг Ca.

МАГНИЙ

Раствор, указанный в частной статье, помещают в коническую колбу вместимостью 500 мл и доводят объем раствора до 300 мл *водой Р*. Прибавляют 10 мл *аммиачного буферного раствора pH 10,0 Р* и около 50 мг *индикаторной смеси протравного черного 11 Р* (эриохром черный Т). Раствор нагревают до температуры около 40°С и титруют при этой температуре *0,1 М раствором натрия эдетата* до перехода фиолетовой окраски раствора в синюю.

1 мл *0,1 М раствора натрия эдетата* соответствует 2,431 мг Mg.

Допускается проводить определение магния по следующей методике:

Точную навеску испытуемого вещества, эквивалентную 0,02-0,03 г магния, растворяют, как указано в частной статье. Прибавляют 50 мл *воды Р*, 10 мл буферного раствора с pH 9,5-10,0; 0,1 г *индикаторной смеси протравного черного 11 Р* (эриохром черный Т) или 7 капель *раствора протравного черного 11 Р* (эриохром черный Т) и титруют *0,05 М раствором натрия эдетата* до синего окрашивания.

1 мл *0,05 М раствора натрия эдетата* соответствует 1,215 мг Mg.

СВИНЕЦ

Раствор, указанный в частной статье, помещают в коническую колбу вместимостью 500 мл и доводят объем раствора *водой Р* до 200 мл. Прибавляют около 50 мг *индикаторной смеси ксиленолового оранжевого Р,* а затем *гексаметилентетрамина Р* до появления фиолетово-розовой окраски раствора. Затем титруют *0,1 М раствором натрия эдетата* до перехода фиолетово-розовой окраски раствора в желтую.

1 мл *0,1 М раствора натрия эдетата* соответствует 20,72 мг Pb.

ЦИНК

Раствор, указанный в частной статье, помещают в коническую колбу вместимостью 500 мл и доводят объем раствора *водой Р* до 200 мл. Прибавляют около 50 мг *индикаторной смеси ксиленолового оранжевого Р,* а затем *гексаметилентетрамина* Р до появления фиолетово-розовой окраски раствора. После этого дополнительно прибавляют 2 г *гексаметилентетрамина Р* и титруют

0,1 М раствором натрия эдетата до перехода фиолетово-розовой окраски раствора в желтую.

1 мл *0,1 М раствора натрия эдетата* соответствует 6,54 мг Zn.

2.5.12. ВОДА: ПОЛУМИКРОМЕТОД (#Метод К.Фишера)

Для титрования используют сосуд вместимостью 60 мл, снабженный двумя платиновыми электродами, трубкой для подвода азота, пробкой, в которую вставляется конец бюретки, и трубкой, заполненной осушающим агентом. Испытуемое вещество вносят в сосуд через трубку, расположенную с противоположной стороны по отношению к трубке-осушителю, которая должна закрываться притертой пробкой. В процессе титрования раствор перемешивают с помощью магнитной мешалки или посредством продувания высушенного азота через раствор.

Конечную точку титрования обнаруживают амперометрически. Электрическая схема состоит из потенциометра с сопротивлением около 2000 Ом, подключенного к источнику постоянного тока с напряжением 1,5 В, который обеспечивает необходимую разность потенциалов. Разность потенциалов отрегулирована таким образом, чтобы через платиновые электроды, соединенные последовательно с микроамперметром, проходил небольшой начальный ток. При прибавлении реактива стрелка микроамперметра отклоняется, но сразу же возвращается в исходное положение. В конце реакции полученное отклонение должно быть неизменным в течение 30 с.

Иодсернистый реактив Р (реактив К.Фишера) используют после определения его титра по воде *(4.1.1)*. Используемые реактивы и растворы должны быть безводными; необходимо принять меры предосторожности для исключения воздействия на них атмосферной влаги. *Йодсернистый реактив Р* необходимо беречь от света и желательно хранить в емкости, снабженной автоматической бюреткой.

Допускается использование йодсернистого реактива, выпускаемого отечественными и зарубежными предприятиями в соответствии с требованиями технических нормативных правовых актов, утвержденных в установленном порядке.

Йодсернистый реактив представляет собой раствор серы диоксида, йода и пиридина в метаноле. Взаимодействие реактива с водой протекает стехиометрически по уравнениям:

$$I_2 + SO_2 + H_2O + 3C_5H_5N \rightarrow 2C_5H_5N{\cdot}HI + C_5H_5NSO_3$$

$$C_5H_5NSO_3 + CH_3OH \rightarrow C_5H_5N{\cdot}HSO_4CH_3$$

Иодсернистый реактив, указанного выше состава, неприменим для анализа соединений, реагирующих с одним или несколькими компонентами реактива, как, например, аскорбиновая кислота, меркаптаны, сульфиды, гидрокарбонаты и карбонаты щелочных металлов, альдегиды, кетоны и др.

При определении воды в твердых веществах, нерастворимых в метаноле, тонко измельченную навеску вещества взбалтывают с метанолом, после чего титруют йодсернистым реактивом. Некоторые вещества или смеси можно

растворять в безводных уксусной кислоте, хлороформе, пиридине и других растворителях.

Имеющиеся в продаже йодсернистые реактивы часто отличаются по составу от йодсернистого реактива Р: в них пиридин заменен на другие основания. Использование таких реактивов необходимо предварительно валидировать с целью подтверждения в каждом конкретном случае, стехиометрии и отсутствия несовместимости между испытуемым веществом и реактивом (1.1 Общие замечания).

Если нет других указаний в частной статье, используют метод А.

МЕТОД А

Около 20 мл *метанола безводного Р* или растворителя, указанного в частной статье, помещают в сосуд для титрования и титруют *иодсернистым реактивом Р,* обнаруживая конечную точку титрования амперометрически. Указанное количество испытуемого вещества быстро помещают в сосуд для титрования. Смесь перемешивают в течение 1 мин и снова титруют *йодсернистым реактивом Р*, обнаруживая конечную точку титрования амперометрически.

МЕТОД В

Около 10 мл *метанола безводного Р* или растворителя, указанного в частной статье, помещают в сосуд для титрования и титруют *йодсернистым реактивом Р*, обнаруживая конечную точку титрования амперометрически.

Затем быстро вносят в сосуд для титрования указанное количество испытуемого вещества и точно измеренный объем *йодсернистого реактива Р*, взятого в избытке приблизительно на 1 мл или объем, указанный в частной статье. Сосуд закрывают пробкой, выдерживают в защищенном от света месте в течении 1 мин или в течение времени, указанного в частной статье, периодически перемешивая содержимое сосуда. Избыток *йодсернистого реактива Р* титруют до первоначального значения силы тока, используя *метанол безводный Р* или растворитель, указанный в частной статье, к которому было прибавлено точно известное количество *воды Р*, эквивалентное около 2,5 г/л.

Конечную точку титрования допускается обнаруживать визуально по изменению окраски титруемой жидкости от желтой до красновато-коричневой при условии обеспечения необходимой точности.

2.5.13. АЛЮМИНИЙ В АДСОРБИРОВАННЫХ ВАКЦИНАХ

Испытуемое вещество гомогенизируют и переносят соответствующее количество, содержащее от 5 мг до 6 мг алюминия, в колбу для сжигания вместимостью 50 мл. Прибавляют 1 мл *серной кислоты Р*, 0,1 мл *азотной кислоты Р* и несколько стеклянных шариков. Нагревают полученный раствор до его помутнения из-за выделяющегося белого дыма. Если на данной стадии наблюдается обугливание, прибавляют несколько капель *азотной кислоты Р* и продолжают кипячение до исчезновение окраски. Смесь охлаждают несколько минут, с осторожностью добавляют 10 мл *воды Р* и кипятят до получения прозрачного раствора. Охлаждают, прибавляют 0,05 мл *метилового оранжевого раствор Р* и нейтрализуют *натрия гидроксида раствором концентрированным Р* (6,5 мл на 7 мл). Если образуется осадок, его растворяют, добавляя по каплям достаточный объем *серной кислоты разведенной Р*. Переносят раствор в

коническую колбу вместимостью 250 мл, остатки в колбе для сжигания смывают 25 мл *воды Р*. Прибавляют 25,0 мл *0,02 М раствора натрия эдетата*, 10 мл *ацетатного буферного раствора рН 4,4 Р*, несколько стеклянных шариков и осторожно кипятят в течение 3 мин, добавляют 0,1 мл *пиридилазонафтола раствор Р* и титруют горячий раствор *0,02 М раствором меди сульфата* до изменения цвета раствора на пурпурно-коричневый.

Испытания повторяют без использования вакцины.

1 мл *0,02 М раствора натрия эдетата* соответствует 0,5396 мг Al.

2.5.14. КАЛЬЦИЙ В АДСОРБИРОВАННЫХ ВАКЦИНАХ

Все растворы, используемые для данного исследования должны готовится с использованием воды Р .

Кальций определяют атомно-эмиссионной спектрометрией (*2.2.22, метод 1*). Исследуемое лекарственное средство гомогенизируют. К 1,0 мл прибавляют 0,2 мл *кислоты хлористоводородной разведенной Р* и разводят до 3,0 мл *водой Р*. Измеряют интенсивность излучения при длине волны 620 нм.

2.5.15. ФЕНОЛ В ИММУНОСЫВОРОТКАХ И ВАКЦИНАХ

Исследуемое лекарственное средство гомогенизируют. Разводят до необходимого объема *водой Р*, чтобы получить раствор, содержащий 15 мкг/мл фенола. Готовят ряд стандартных растворов с *фенолом Р,* содержащих 5 мкг, 10 мкг, 15 мкг, 20 мкг и 30 мкг/мл фенола соответственно. К 5 мл исследуемого раствора и к 5 мл каждого стандартного раствора прибавляют 5 мл *буферного раствора рН 9,0 Р*, 5 мл раствора 1 г/л *аминопиразолона Р* и 5 мл раствора 50г/л *калия ферроцианида Р*. Дают отстояться 10 мин и измеряют интенсивность окрашивания при длине волны 546 нм.

Строят градуировочный график и рассчитывают содержание фенола в лекарственном средстве.

2.5.16. БЕЛОК В ПОЛИСАХАРИДНЫХ ВАКЦИНАХ

Исследуемый раствор. Используют мерную колбу необходимого объема для приготовления раствора, содержащего около 5 мг/мл сухого полисахарида. Количественно переносят содержимое контейнера в колбу и разводят до объема *водой Р*. Помещают 1 мл раствора в стеклянную пробирку и добавляют 0,15 мл раствора 400 г/л *кислоты трихлоруксусной Р.* Встряхивают, дают отстояться 15 мин, центрифугируют в течение 10 мин при скорости вращения 5000 об/мин и удаляют надосадочную жидкость. К полученному осадку добавляют 0,4 мл *0,1 М раствора натрия гидроксида Р.*

Стандартные растворы. Разводят 0,100 г *альбумина бычьего Р* в 100 мл *0,1 М натрия гидроксида* (основной раствор, содержащий 1 г/л белка). Разводят 1 мл основного раствора до 20 мл *0,1 М раствором натрия гидроксида Р* (рабочий раствор 1 с концентрацией белка 50 мг/л). Разводят 1 мл основного раствора до 4 мл *0,1 М раствором натрия гидроксида Р* (рабочий раствор 2 с концентрацией протеина 250 мг/л). В 6 стеклянных пробирок помещают 0,10 мл, 0,20 мл и 0,40 мл рабочего раствора 1 и 0,15 мл, 0,20 мл и 0.25 мл рабочего раствора 2. доводят объем в каждой пробирке до 0,40 мл, используя *0,1 М раствор натрия гидроксида Р.*

Готовят контрольный раствор, используя 0,40 мл *0,1 М раствор натрия гидроксида Р*

В каждую пробирку добавляют 2 мл *раствора медно-тартратногоо Р* встряхивают и дают отстояться в течение 10 мин. В каждую пробирку добавляют по 0,2 мл смеси равных объемов *фосфомолибденовольфрамового реактива Р* и *воды Р*, приготовленной непосредственно перед использованием. Закрывают пробирки, перемешивают, переворачивают их и дают отстояться в темном месте в течение 30 мин. Голубой цвет остается стабильным в течение 60 мин. При необходимости центрифугируют для получения прозрачных растворов.

Измеряют оптическую плотность (*2.2.25*) каждого раствора при длине волны 760 нм, используя контрольный раствор в качестве раствора сравнения. Строят градуировочный график на основе оптической плотности 6 стандартных растворов и соответствующей концентрации белка и сравнивают с графиком показателей белка в исследуемом растворе.

2.5.17. НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ В ПОЛИСАХАРИДНЫХ ВАКЦИНАХ

Исследуемый раствор. Для приготовления раствора, содержащего около 5 мг/мл сухого полисахарида, используют мерную колбу необходимого объема Количественно переносят содержимое контейнера в колбу и разводят до необходимого объема *водой Р*. При необходимости разводят исследуемый раствор до достижения оптической плотности, подходящей к используемому прибору. Измеряют оптическую плотность (*2.2.25*) при длине волны 260 нм, используя *воду Р* в качестве раствора сравнения.

Оптическая плотность раствора 1 г/л нуклеиновой кислоты при длине волны 260 нм равна 20.

2.5.18. ФОСФОР В ПОЛИСАХАРИДНЫХ ВАКЦИНАХ

Исследуемый раствор. Для приготовления раствора, содержащего около 5 мг/мл сухого полисахарида, используют мерную колбу необходимого объема. Количественно переносят содержимое контейнера в колбу и разводят до объема *водой Р*. Разводят раствор так, чтобы объем, используемый в опыте (1 мл), содержал около 6 мкг фосфора. Переносят 1,0 мл раствора в пробирку на 10 мл из термостойкого стекла.

Стандартные растворы. 0,2194 г *калия дигидрофосфата Р* разводят в 500 мл *воды Р* таким образом, чтобы концентрация раствора была равна 0,1 мг/мл фосфора. 5,0 мл раствора разводят до 100,0 мл *водой Р*. Переносят 0,5 мл, 1,0 мл и 2,0 мл разведенного раствора в три пробирки из термостойкого стекла. Готовят контрольный раствор, используя 2,0 мл *воды Р* в пробирке из термостойкого стекла.

Во все пробирки добавляют 0,2 мл *кислоты серной Р* и подогревают на масляной бане при 120 С в течение 1 ч, а затем при 160 С до появления белого дыма (около 1 ч). Прибавляют 0,1 мл *кислоты хлорной Р* и нагревают при 160°С до обесцвечивания раствора (около 90 мин). Охлаждают и прибавляют в каждую пробирку 4 мл воды очищенной и 4 мл реактива *аммония молибдата Р.* Нагревают на водяной бане при 37 С в течение 90 мин и охлаждают. Доводят объем до 10,0 мл с помощью *воды Р*. Голубой цвет остается стабильным в течение нескольких часов.

Измеряют оптическую плотность (*2.2.25*) каждого раствора при длине волны 820 нм, используя контрольный раствор в качестве раствора сравнения. Строят градуировочный график на основе оптической плотности трех стандартных растворов и соответствующей концентрации фосфора и сравнивают с оптической плотностью исследуемого раствора.

2.5.19. *О*-АЦЕТИЛ В ПОЛИСАХАРИДНЫХ ВАКЦИНАХ

Исследуемый раствор. Для приготовления раствора, содержащего около 5 мг/мл сухого полисахарида, используют мерную колбу необходимого объема. Количественно переносят содержимое контейнера в колбу и разводят до необходимого объема *водой Р*. Раствор разводят так, чтобы объемы, используемые в опыте, содержали от 30 мкг до 600 мкг ацетилхолин хлорида (*О*-ацетил). Помещают 0,3 мл, 0,5 мл и 1,0 мл по два раза в 6 пробирок (3 реагирующих раствора и 3 корректирующих раствора).

Стандартные растворы. Растворяют 0,150 г *ацетилхолин хлорида Р* в 10 мл *воды Р* (основной раствор, содержащий 15 г/л ацетилхолин хлорида). Непосредственно перед использованием разводят 1 мл основного раствора до 50 мл *водой Р* (рабочая концентрация 1 – 300 мкг/мл ацетилхолин хлорида). Непосредственно перед использованием разводят 1 мл основного раствора до 25 мл *водой Р* (рабочая концентрация 2 – 600 мкг/мл ацетилхолин хлорида). Помещают 0,1 мл и 0,4 мл рабочей концентрации 1 дважды (реагирующий и корректирующий растворы) в 4 пробирки и 0,6 мл и1,0 мл рабочей концентрации 2 дважды (реагирующий и корректирующий растворы) в другие 4 пробирки.

Готовят контрольный раствор, используя 1 мл *воды Р*.

Доводят объем в каждой пробирке до 1 мл *водой Р*. Добавляют 1,0 мл *4 М раствора кислоты хлористоводородной* в каждую из корректирующих пробирок и в контрольную пробу. Добавляют 2,0 мл щелочного раствора *гидроксиламина Р* в каждую пробирку. Дают пройти реакции в течение 2 мин и добавляют в каждую из пробирок с реагирующим раствором 1 мл *4 М раствора кислоты хлористоводородной.* Прибавляют 1,0 мл раствора 100 г/л *железа хлорида Р* в *0,1 М растворе кислоты хлористоводородной* в каждую пробирку, закрывают пробирки пробками и сильно встряхивают для удаления пузырьков.

Измеряют оптическую плотность (*2.2.25*) каждого раствора при длине волны 540 нм, используя контрольный раствор в качестве раствора сравнения. Для каждого реагирующего раствора вычитают оптическую плотность соответствующего корректирующего раствора. Строят градуировочный график на основании скорректированных оптических плотностей для 4 стандартных растворов и соответствующего содержания ацетилхолин хлорида и сравнивают с графиком содержание ацетилхолин хлорида в исследуемом растворе для каждого исследуемого объема. Рассчитывают среднее по трем величинам.

1 моль ацетилхолин хлорида (181,7 г) соответствует 1 молю *О*-ацетила (43,05 г).

2.5.20. ГЕКСОЗАМИНЫ В ПОЛИСАХАРИДНЫХ ВАКЦИНАХ

Исследуемый раствор. Для приготовления раствора, содержащего около 5 мг/мл сухого полисахарида, используют мерную колбу необходимого объема. Количественно переносят содержимое контейнера в колбу и разводят до объема *водой Р*. Раствор разводят таким образом, чтобы объемы, используемые для опыта, содержали от 125 мкг до 500 мкг глюкозамина (гексозамина). В градуированную пробирку вносят 1,0 мл разведенного раствора.

Стандартные растворы. 60 мг *глюкозамин гидрохлорида Р* растворяют в 100 мл *воды Р* (основной раствор, содержащий 0,500 г/л глюкозамина). Помещают 0,25 мл, 0,50 мл, 0,75 мл, и 1,0 мл рабочей концентрации в 4 градуированные пробирки.

Готовят контрольную пробу, используя 1 мл *воды Р*.

Доводят объем в каждой пробирке до 1 мл *водой Р*. В каждую пробирку прибавляют 1 мл (292 г/л) раствора *кислоты хлористоводородной Р.* Закрывают пробирки пробками и помещают в водяную баню на 1 ч. Охлаждают до комнатной температуры. В каждую пробирку добавляют 0,05 мл (5 г/л) раствора *тимолфталеина Р* в *спирте Р*. Прибавляют раствор 200 г/л *натрия гидроксида Р* до голубого окрашивания, а затем раствор *1 М кислоты хлористоводородной* до

обесцвечивания раствора. Доводят объем в каждой пробирке до 10 мл *водой Р* (нейтрализованные гидролизаты).

Во вторую серию градуированных пробирок объемом 10 мл вносят 1 мл каждого нейтрализованного гидролизата. В каждую пробирку добавляют 1 мл ацетилацетонового реактива (смесь, приготавливаемая непосредственно перед использованием – 1 объем *ацетилацетона Р* и 50 объемов раствора 53г/л *натрия карбоната безводного Р)*. Закрывают пробирки пробками и помещают на водяную баню при температуре 90 С на 45 мин. Охлаждают до комнатной температуры. В каждую пробирку добавляют 2,5 мл *спирта Р* и 1,0 мл раствора диметиламинобензальдегида (приготавлитвают непосредственно перед использованием: растворяют 0,8 г *диметиламинобензальдегида Р* в 15 мл *спирта Р*, добавляют 15 мл *кислоты хлористоводородной Р*) и доводят объем в каждой пробирке до 10 мл *спиртом Р*. Пробирки закрывают, содержимое перемешивают переворачивая пробирки и оставляют в темном месте на 90 мин. Измеряют оптическую плотность (*2.2.25*) каждого раствора при длине волны 530 нм, используя контрольную пробу в качестве раствора сравнения. Строят градуировочный график на основании оптических плотностей для 4 стандартных растворов и соответствующего содержания гексозамина и определяют значение количества гексозамина в исследуемом растворе.

2.5.21. МЕТИЛПЕНТОЗЫ В ПОЛИСАХАРИДНЫХ ВАКЦИНАХ

Исследуемый раствор. Для приготовления раствора, содержащего около 5 мг/мл сухого полисахарида используют мерную колбу необходимого объема. Содержимое контейнера количественно переносят в колбу и разводят до необходимого объема *водой Р.* Раствор разводят таким образом, чтобы объемы, предназначенные для тестирования, содержали от 2 мкг до 20 мкг рамнозы (метилпентозы). В три пробирки помещают 0,25 мл, 0,50 мл и 1,0 мл разведенного раствора.

Стандартные растворы. Разводят 0,100г *рамнозы Р* в 100мл *воды Р* (основной раствор, содержащий 1г/л метилпентозы). Непосредственно перед использованием разводят 1 мл основного раствора до 50 мл *водой Р* (рабочая концентрация 20мг/л метилпентозы). В 5 пробирок помещают 0,10 мл, 0,25 мл, 0,50 мл, 0,75 мл и 1,0 мл рабочей концентрации.

Готовят контрольную пробу с использованием 1 мл *воды Р*

Объем в каждой пробирке доводят до 1 мл с использованием *воды Р*. Пробирки помещают в ледяную воду, прибавляют по каплям с постоянным помешиванием по 4,5 мл охлажденной смеси, состоящей из одного объема *воды Р* и 6 объемов *кислоты серной Р.* Пробирки нагревают до комнатной температуры и помещают на водяную баню на несколько минут. Охлаждают до комнатной температуры. Добавляют в каждую пробирку 0,10 мл раствора 30 г/л *цистеин гидрохлорида Р* приготовленного непосредственно перед применением. Взбалтывают и дают отстояться в течение 2 ч.

Измеряют оптическую плотность (*2.2.25*) каждого раствора при длине волны 396 нм и 430 нм, используя контрольную пробу в качестве раствора сравнения. Для каждого раствора рассчитывают разницу между оптической плотностью, измеренной при длине волны 396 нм и оптической плотностью, измеренной при длине волны 430 нм. Строят градуировочный график на основании разницы оптических плотностей для 5 стандартных растворов и соответствующей концентрации метилпентозы, а также строят график концентрации метилпентозы в исследуемом растворе для каждого тестируемого объема. Рассчитывают среднюю величину по трем значениям.

2.5.22. УРОНОВЫЕ КИСЛОТЫ В ПОЛИСАХАРИДНЫХ ВАКЦИНАХ

Исследуемый раствор. Для приготовления раствора, содержащего около 5 мг/мл сухого полисахарида, используют мерную колбу необходимого объема. Переносят содержимое контейнера в колбу и разводят до необходимого объема *водой Р*. Раствор разводят таким образом, чтобы объемы, предназначенные для исследования, содержали от 4 мкг до 40 мкг глюкуроновой кислоты (уроновых кислот). В 3 пробирки помещают 0,25 мл, 0,50 мл и 1,0 мл разведенного раствора.

Стандартные растворы. Растворяют 50 мг *натрия глюкуроната Р* в 100 мл *воды Р* (основной раствор, содержащий 0,4 г/л глюкуроновой кислоты). Непосредственно перед использованием разводят 5 мл основного раствора до 50 мл, используя *воду Р* (рабочая концентрация глюкуроновой кислоты 40 мг/л). В 5 пробирок помещают 0,10 мл, 0,25 мл, 0,50 мл, 0,75 мл, и 1,0 мл рабочей концентрации.

Готовят контрольную пробу, используя 1 мл *воды Р.*

Доводят объем в каждой пробирке до 1 мл *водой Р.* Помещают пробирки в ледяную воду и, постоянно помешивая, по каплям добавляют в каждую пробирку по 5,0 мл *боратного раствора Р*. Закрывают пробирки пробками и помещают на 15 мин на водяную баню. Охлаждают до комнатной температуры. В каждую пробирку добавляют 0,20 мл раствора 1,25 г/л *карбазола Р* в *этаноле Р.* Закрывают пробирки пробками и помещают на 15 мин на водяную баню. Охлаждают до комнатной температуры. Измеряют оптическую плотность (*2.2.25*) каждого раствора при длине волны 530 нм, используя контрольную пробу в качестве раствора сравнения.

Строят градуировочный график оптических плотностей для 5 стандартных растворов и соответствующих концентраций глюкуроновой кислоты, и определяют концентрации глюкуроновой кислоты в исследуемом растворе для каждого тестируемого объема. Рассчитывают среднюю величину по трем значениям.

2.5.23. СИАЛОВАЯ КИСЛОТА В ПОЛИСАХАРИДНЫХ ВАКЦИНАХ

Исследуемый раствор. Содержимое одного или нескольких контейнеров количественно переносят в мерную колбу соответствующего объема. Чтобы получить раствор с концентрацией полисахарида около 250 мкг/мл, содержимое разводят до необходимого объема *водой Р.* 4,0 мл этого раствора переносят с помощью шприца в 10 мл ультрафильтрационную кювету, пропускающую молекулы с относительной молекулярной массой менее 50 000. Дважды промывают шприц *водой Р* и промывную жидкость тоже переносят в ультрафильтрационную кювету. Проводят ультрафильтрацию, постоянно перемешивая жидкость, в присутствии азота под давлением около 150 kПа. Наполняют кювету *водой Р* каждый раз, когда объем жидкости в ней уменьшается до 1 мл до тех пор, пока не профильтруется 200 мл, а оставшийся объем в кювете не будет составлять 2 мл. Используя шприц, переносят оставшуюся жидкость в 10 мл мерную колбу. Промывают кювету 3 раза по 2 мл *водой Р* каждый раз. Смывную жидкость сливают в колбу и доводят объем до 10 мл *водой Р* (испытуемый раствор). В каждую из двух опытных пробирок вносят 2,0 мл испытуемого раствора.

Стандартные растворы. Используют стандартные растворы, описанные в частной статье.

Готовят 2 серии из 3 пробирок. В пробирки каждой серии помещают 0,5 мл, 1,0 мл и 1,5 мл стандартного раствора, соответствующего типу вакцины, предназначенной для исследования, и корректируют *водой Р* объем в каждой пробирке до 2-х мл. Готовят контрольную пробу, используя 2,0 мл *воды Р* в каждой из двух пробирок.

В каждую пробирку добавляют 5,0 мл *резорцинового реактива Р.* Нагревают при 105° С в течение 15 мин, охлаждают в холодной воде и переносят пробирки на баню с ледяной водой. Во все пробирки добавляют 5 мл *спирта изоамилового Р* и

тщательно перемешивают. Помещают в емкость с ледяной водой на 15 минут. Центрифугируют пробирки и держат их в емкости с ледяной водой до проведения исследования методом абсорбционной спектрофотометрии. Измеряют оптическую плотность (*2.2.25*) надосадочной жидкости при длинах волн 580 нм и 450 нм, используя *спирт изоамиловый Р* в качестве раствора сравнения. Для каждой длины волны рассчитывают оптическую плотность как среднее значений, полученных в двух идентичных растворах. Вычитают среднее значение для контрольного раствора из средних значений, полученных для других растворов.
Строят график, отражающий разницу между оптической плотностью при длинах волн 580 нм и 450 нм стандартных растворов как функцию содержания *N*-ацетилнейраминовой кислоты и определяют концентрации N-ацетилнейраминовой кислоты (сиаловой кислоты) в исследуемом растворе.

2.5.24. ДИОКСИД УГЛЕРОДА В ГАЗАХ

Диоксид углерода в газах определяется с помощью инфракрасного анализатора (Рисунок 2.5.24.-1).

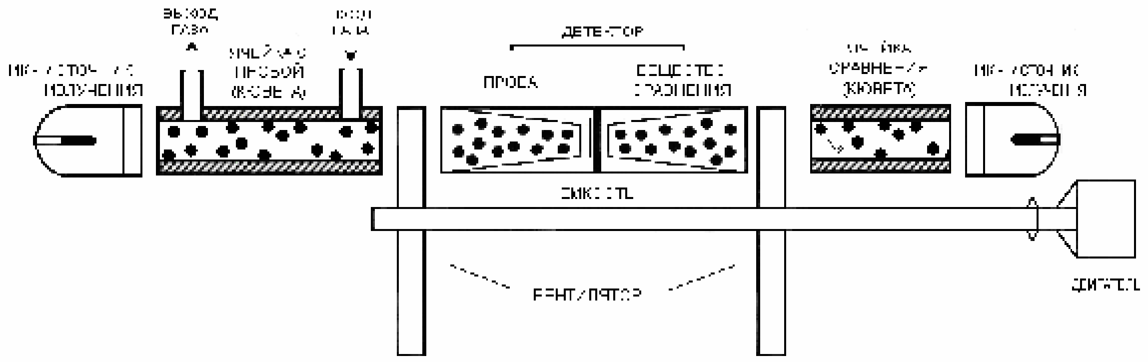


Рисунок 2.5.24.-1. – *Инфракрасный анализатор*

Инфракрасный анализатор включает в себя систему, генерирующую 2 идентичных инфракрасных пучка, состоящий из спиралей, электронагреваемых до низкой температуры слабого каления и оснащенного рефлекторами. Один луч проходит сквозь камеру, предназначенную для пробы, а другой сквозь референтную камеру. Камера для пробы получает поток исследуемого газа, а референтная камера содержит *азот Р1*. Две камеры детектора заполнены *диоксидом углерода Р1* и автоматически получают выборочное излучение. Поглощение излучения вызывает нагревание и дифференциальное расширение газа в двух камерах, позволяет исследовать поглощение части испускаемого излучения диоксидом углерода в исследуемом газе. Разница давления между двумя камерами детектора приводит к растяжению металлической диафрагмы, разделяющей их. Эта диафрагма является частью конденсатора, емкость которого меняется по мере изменения давления, которое само по себе зависит от содержания диоксида углерода в исследуемом газе. Поскольку инфракрасные лучи периодически блокируются вращающимся прерывателем, происходит частотное модулирование электрического сигнала.

2.5.25. ОКСИД УГЛЕРОДА В ГАЗАХ

МЕТОД I

Прибор. Прибор (Рисунок 2.5.25.-1) состоит из следующих частей, соединенных последовательно:

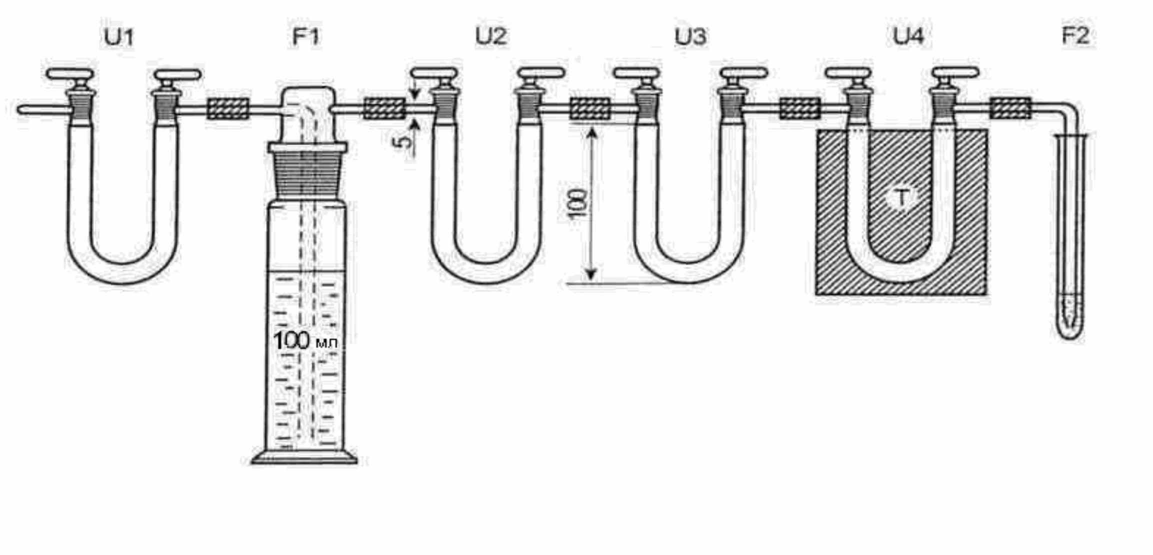


Рисунок 2.5.25.-1. – *Прибор для определения угарного газа*
Размеры представлены в миллиметрах

— U-образная трубка (U_1), содержащая *безводный силикагель Р*, пропитанный *триоксидом хрома Р*,
— Промывочная емкость (F_1), содержащая 100 мл раствора 400 г/л *калия гидроксида Р*,
— U- образная трубка (U_2), содержащая шарики *калия гидроксида Р*,
— U- образная трубка (U_3), содержащая *фосфора (V) оксид Р*, распределенный на предварительно гранулированную плавленную пензу,
— U- образная трубка (U_4), содержащая 30 г *йода (V) оксида* перекристаллизованного *Р* в гранулах, предварительно высушенного при температуре 200°С и поддерживаемого при температуре 120°С (*Т*) во время теста. Пентоксид йода упакован в трубке в 1 см столбики, разделенные 1см столбиками стекловаты для достижения эффективной длины 5 см,
— реакторная трубка (F_2) содержащая 2,0 мл *раствора калия йодида Р* и 0,15 мл *раствора крахмала Р*.

Метод. 5,0 литров *аргона Р* пропускают через аппарат и при необходимости обесцвечивают голубой цвет йодного раствора, добавляя минимально необходимое количество свежеприготовленного *0,002 М раствора натрия тиосульфата Р*. Газ продолжают пропускать до тех пор, пока после прохождения 5,0 литров *аргона Р* для обесцвечивания йодного раствора будет требоваться всего 0,045 мл *0,002 М раствора натрия тиосульфата Р*. Исследуемый газ, пропускают из цилиндра через аппарат, учитывая предписанные в частной статье объем и скорость потока. Остатки выделившегося йода в реакторной пробирке извлекают, пропустив через аппарат 1,0 литр *аргона Р*. Выделившийся йод титруют *0,002 М раствором натрия тиосульфата Р.* Проводят контрольный опыт, используя одинаковый объем *аргона Р*. Разница между объемами *0,002 М раствора натрия тиосульфата,* использованного при титровании не должна превышать указанное в частной статье значение.

МЕТОД II

Моноксид углерода в газах может быть определен с помощью инфракрасного анализатора (см. Рисунок 2.5.25.-2).

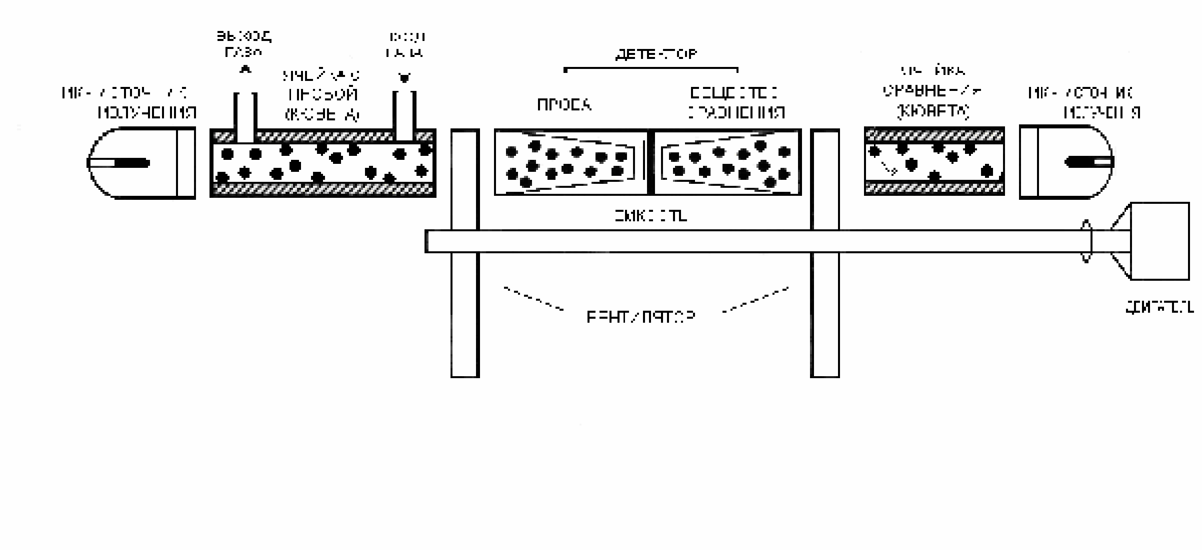


Рисунок 2.5.25.- 2. – *Инфракрасный анализатор*

Инфракрасный анализатор включает в себя систему, генерирующую 2 идентичных инфракрасных пучка, состоящую из спиралей, электронагреваемых до низкой температуры слабого каления и оснащенную рефлекторами. Один луч проходит сквозь камеру, предназначенную для пробы, а другой сквозь референтную камеру. Камера для пробы получает поток исследуемого газа, а референтная камера содержит *азот Р1*. Две камеры детектора заполнены *оксидом углерода Р1* и автоматически получают выборочное излучение. Поглощение этого излучения вызывает нагревание и дифференциальное расширение газа в двух камерах, позволяя исследовать поглощение части испускаемого излучения оксидом углерода в газе. Разница давления между двумя камерами детектора приводит к растяжению металлической диафрагмы, разделяющей их. Эта диафрагма является частью конденсатора, емкость которого меняется по мере изменения давления, которое само по себе зависит от содержания оксида углерода в исследуемом газе. Поскольку инфракрасные лучи периодически блокируются вращающимся прерывателем, происходит частотное модулирование электрического сигнала.

2.5.26. ОКСИД АЗОТА И ДИОКСИД АЗОТА В ГАЗАХ

Оксид азота и диоксид азота в газах определяется хемилюминесцентным анализатором (Рисунок 2.5.26.-1).

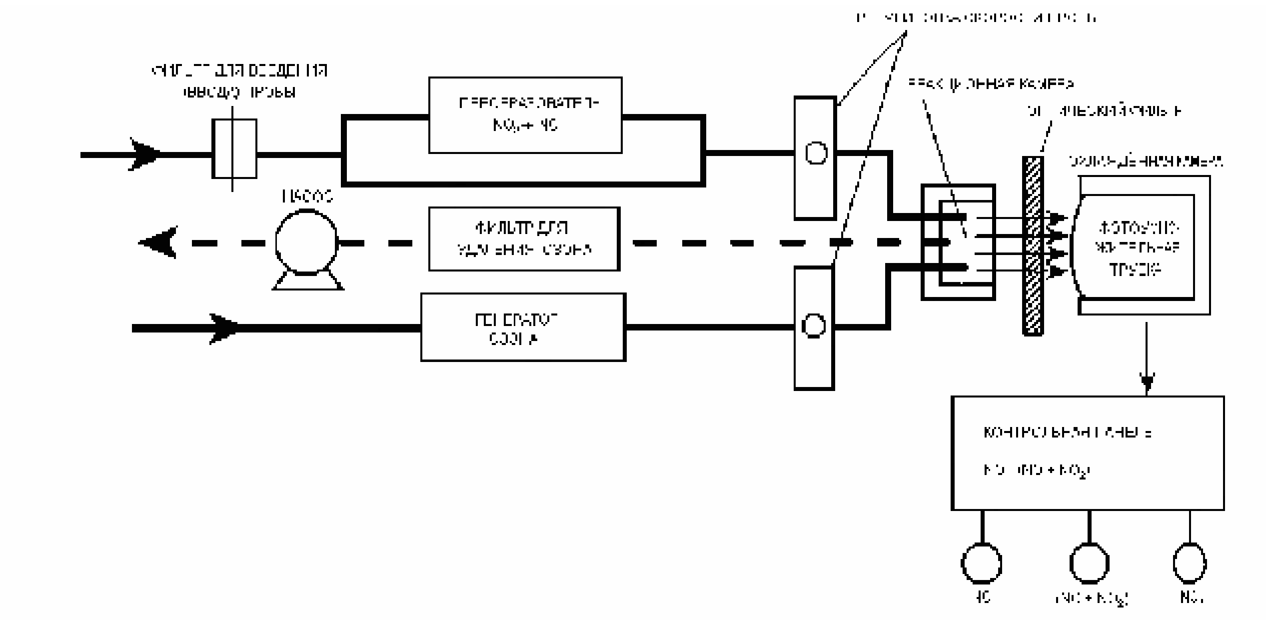


Рисунок 2.5.26.-1. – Хемилюминесцентный анализатор

Конструкция аппарата представляет собой следующее:

- фильтр, проверяющий и контролирующий поток исследуемого газа;
- конвертер, преобразующий диоксид азота в оксид азота, для определения суммарного содержания оксида азота и диоксида азота. Перед применением необходимо проверить эффективность конвертера;
- озоновый генератор, контролирующий скорость потока; озон производится высоковольтными электрическими разрядами через два электрода; в озоновый генератор подается чистый кислород или безводный воздух окружающей среды, а концентрация озона должна намного превышать максимальное содержание всех определяемых оксидов азота,
- камера, в которой взаимодействуют оксид азота с озоном;
- система определения слабого излучения при длине волны 1,2 мкм, состоящая из селективного оптического фильтра и фотоэлектронного множителя.

2.5.27. КИСЛОРОД В ГАЗАХ

Кислород в газах определяется с помощью парамагнитного анализатора.
Принцип метода основан на высокой парамагнитной чувствительности молекулы кислорода. Кислород проявляет сильное взаимодействие с магнитными полями. Это взаимодействие измеряется количеством электричества, зависящего от величины содержания кислорода. Измерения концентрации кислорода зависят от давления и температуры, и если анализатор автоматически не реагирует на изменения температуры и давления, необходимо произвести калибровку прибора непосредственно перед самым использованием. Поскольку парамагнитный эффект кислорода имеет линейный характер, погрешность прибора не должна превышать 0,1%.

Градуировка прибора. Градуировка установки производится следующим образом:

- в соответствии с инструкцией изготовителя прибора устанавливают нулевой уровень, пропуская через прибор *азот Р1* с соответствующей скоростью потока, пока не будут получены постоянные показатели;

- устанавливают соответствующий предел, пропуская воздух (20,9% *об/об* O_2) через прибор с необходимой скоростью потока, пока не будут получены постоянные показатели. Предел должен быть установлен на 20,9% *об/об* в соответствии с инструкциями производителя.

Исследование. Пропускают исследуемый газ, через прибор с постоянной скоростью потока, пока не будут получены необходимые показания

2.5.28. ВОДА В ГАЗАХ

Вода в газах определяется с помощью электролитического гигрометра, описанного ниже.

Измерительная камера состоит из тонкой пленки фосфора (V) оксида, расположенной между 2 платиновыми проводами в качестве электродов. Водный пар в исследуемом газе поглащается фосфора (V) оксидом, который преобразуется в фосфорную кислоту, являющуюся электрическим проводником. Постоянное напряжение вокруг электродов производит электролиз воды и регенерацию фосфора (V) оксида. Затем измеряется возникающий электрический ток, который пропорционален содержанию воды в исследуемом газе. Данная система является самокалибрующейся, поскольку она соответствует закону Фарадея. Берут образец исследуемого газа и оставляют его для уравновешивания при комнатной температуре. Постоянно пропускают газ через камеру, пока не получат стабильные показатели. Измеряют содержание воды в исследуемом газе. Необходимо следить, чтобы в течение всего периода работы прибора температура была постоянной.

2.5.29. СЕРНИСТЫЙ ГАЗ

В колбу (*A*) вливают 150 мл *воды Р* (Рисунок 2.5.29.-1) и через всю систему пропускают *диоксид углерода Р* в течение 15 мин со скоростью 100 мл/мин. К 10 мл разведенного *раствора пероксида водорода Р* добавляют 0,15 мл раствора 1 г/л *бромофенолового синего Р* в *спирте Р* (20% *об/об*).Затем прибавляют *0,1 М раствор натрия гидроксида Р* до появления фиолетово-синий оттенка. Раствор помещают в пробирку (*D*). Не прерывая поток диоксида углерода, снимают воронку (*B*) и через образовавшееся отверстие вводят в колбу (*A*) 25,0 г исследуемого вещества при помощи100 мл *воды Р*. Через воронку прибавляют 80 мл *кислоты хлористоводородной разведенной Р* и кипятят в течение 1 ч. Открывают пробку воронки и останавливают поток диоксида углерода, а также нагревание и охлаждение воды. Переносят содержимое пробирки с небольшим количеством *воды Р* в 200 мл коническую колбу с широким горлом. Колбу нагревают на водяной бане в течение 15 мин и дают остыть. Добавляют 0,1 мл раствора 1 г/л *бромфенолового синего Р* в *спирте Р* (20% *об/об*) и титруют *0,1 М раствором натрия гидроксида* до изменения цвета с желтого на фиолетово-синий. Параллельно проводят контрольный опыт.

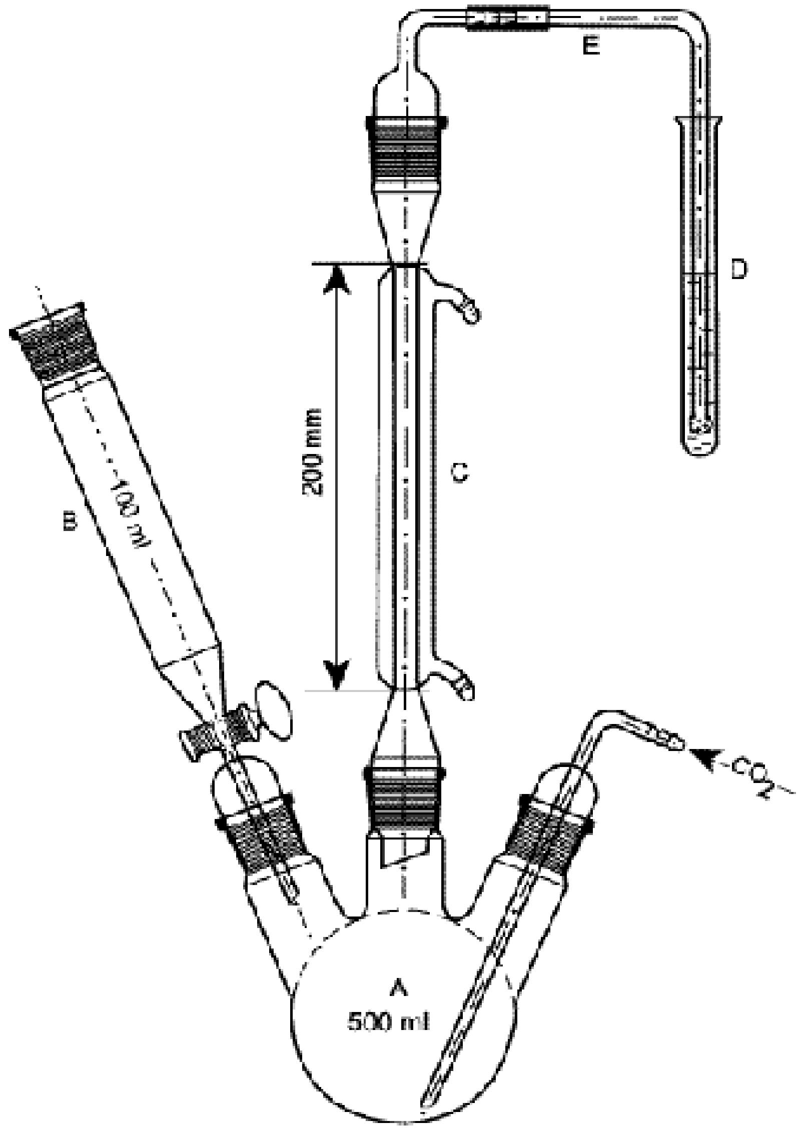


Рисунок 2.5.29.-1.– *прибор для определения диоксида серы*

Рассчитывают содержание сернистого газа в пропорции на миллион, используя уравнение:

$$\text{Содержание сернистого газа} = 128 \cdot a,$$

где:
а – число миллилитров *0,1 М раствора натрия гидроксида*.

2.5.30. ОКИСЛЯЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА

В 125 мл коническую колбу с притертой пробкой вносят 4,0 г исследуемого вещества и добавляют 50,0 мл *воды Р*. Закрывают пробкой и взбалтывают в течение 5 мин. Переносят содержимое в 50 мл центрифужную пробирку с притертой пробкой и центрифугируют. Затем 30 мл чистой надосадочной жидкости переносят в 125 мл коническую колбу с притертой пробкой, добавляют 1 мл *кислоты уксусной ледяной Р* и от 0,5 г до 1,0 г *калия йодида Р.* Закрывают пробкой, взбалтывают и дают отстояться 25 – 30 мин в темном месте. Затем прибавляют 1 мл *раствора крахмала Р* и титруют *0,002 М раствором натрия тиосульфата* до исчезновения окраски.

Проводят контрольный опыт. На титрование расходуется не более 1,4 мл *0,002 М раствора натрия тиосульфата* (0,002% в пересчете на H_2O_2).

1 мл *0,002 М раствора натрия тиосульфата* соответствует 34 мкг окисляющих веществ, рассчитанных как пероксид водорода.

2.5.31. РИБОЗА В ПОЛИСАХАРИДНЫХ ВАКЦИНАХ

Исследуемый раствор. Для приготовления раствора, содержащего около 5 мг/мл сухого полисахарида используют мерную колбу необходимого объема. Содержимое контейнера количественно переносят при помощи *воды Р* в колбу и доводят этим же растворителем до необходимого объема с содержанием рибозы от 2,5 мкг до 25 мкг рибозы. Помещают 0,20 мл и 0,40 мл разведенного раствора в пробирки, получая три серии каждого раствора.

Стандартные растворы. Растворяют 25 мг *рибозы Р* в *воде Р* и доводят раствор этим же растворителем до 100,0 мл (основной раствор, содержащий 0,25 г/л рибозы). Непосредственно перед использованием разводят 1 мл основного раствора до 10,0 мл *водой Р* (рабочая концентрация: 25 мг/л рибозы). Помещают 0,10 мл, 0,20 мл, 0,40 мл, 0,60 мл, 0,80 мл и 1,0 мл рабочей концентрации в шесть пробирок.

Готовят контрольный раствор, используя 2 мл *воды Р*.

Доводят объем в каждой пробирке до 2 мл, используя *воду Р*. Встряхивают. Добавляют в каждую пробирку 2 мл раствора 0,5 г/л *железа хлорида Р* в *кислоте хлористоводородной Р* и встряхивают. Добавляют 0,2 мл раствора 100 г/л *орцина Р* в *этаноле Р*. Помещают пробирки на водяную баню на 20 мин. Охлаждают в ледяной воде. Измеряют оптическую плотность (*2.2.25*) каждого раствора при длине волны 670 нм, используя контрольный раствор в качестве раствора сравнения. На основании показателей 6 стандартных растворов и соответствующего содержания рибозы строят градуировочный график и определяют содержание рибозы в исследуемом растворе для каждого объема. Рассчитывают среднее значение по 3 полученным результатам.

2.5.32. ВОДА: МИКРООПРЕДЕЛЕНИЕ

ПРИНЦИП

Кулонометрическое титрование воды основано на количественной реакции воды с сернистым газом и йодом в безводной среде в присутствии основы с большой буферной способностью. В отличие от объемного метода (*2.5.12*) йод получается электрохимическим способом в реакторной камере. Йод, получаемый на аноде, сразу взаимодействует с водой и сернистым газом, содержащимся в реакторной камере. Количество воды в веществе прямо пропорционально количеству электричества, выделенного до конечного результата титрования. После расхода всей воды, находящейся в камере, достигается конечный результат и выделяется йод. Один моль йода соответствует одному молю воды, а количество электричества 10,71 Кл соответствует 1 мг воды.

Вода удаляется из системы предварительным электролизом. Индивидуальные определения могут выполняться последовательно в том же растворе реагента, при следующих условиях:

— каждый компонент исследуемой смеси совместим с другими компонентами;

— других реакций не происходит;

— объем и емкость воды электролитического реагента достаточны.

Кулонометрическое титрование ограничено количественным определением малых объемов воды, при этом рекомендуется от 10 мкг до 10 мг воды.

Точность метода предопределяется степенью, до которой атмосферная влажность исключается из системы. Система должна контролироваться измерением количества базового отклонения.

Прибор. Прибор состоит из реакторной камеры, электродов и магнитной мешалки. Реакторная камера состоит из большого анодного отдела и меньшего катодного отдела. В зависимости от конструкции электрода, оба отделения могут быть разделены диафрагмой. Каждое отделение содержит платиновый электрод. Жидкость или растворенные образцы вводятся через отверстие для ввода пробы с помощью шприца. В качестве альтернативы может использоваться техника выпаривания, при которой проба нагревается в пробирке (печке) и вода выпаривается и сохраняется в камере как поток сухого инертного газа. Следует избегать попадания в камеру твердых образцов. При работе необходимо предпринимать меры предосторожности, как, например, попадание влаги из воздуха, работа в защитной камере с перчатками в атмосфере сухого инертного газа. Процедуры анализа должны контролироваться с помощью электронных приборов, показывающих результаты.

Метод. Отделение реакторной камеры заполняют *электролитическим реактивом для микроопределения воды Р* в соответствии с инструкциями производителя и выполняют кулометрическое титрование до получения стабильного конечного результата. В реакторную камеру вносят соответствующее количество исследуемого вещества, перемешивают в течение 30 с, если в частной статье не указано иное, и опять титруют до получения стабильного конечного результата. В случае использования печи необходимое количество образца вносят в пробирку и нагревают. После выпаривания воды из пробы в титрующей камере начинают титрование. Записывают показания прибора и при необходимости рассчитывают процентный состав или количество воды, присутствующее в образце. При необходимости, когда этого требует тип образца или подготовка образца, выполняют контрольный опыт.

ПОДТВЕРЖДЕНИЕ ТОЧНОСТИ

Между двумя последовательными титрованиями образца вносят тщательно взвешенное количество *воды Р* или *стандартного раствора для микроопределения воды Р* того же порядка, что и в образце и производят кулонометрическое титрование. Скорость восстановления должна быть в диапазоне от 97,5% до 102,5% для навески 1000 мкг H_2O и в диапазоне 90,0% - 110,0% для навески 100 мкг H_2O.

2.5.33. ОБЩИЙ БЕЛОК

Многие из методов анализа, которые описаны в данном разделе, могут выполняться с использованием наборов, производимых изготовителями.

МЕТОД 1

Белок в растворе поглощает ультрафиолетовый свет при длине волны 280 нм благодаря присутствию в структуре ароматических аминокислот, главным образом тирозина и триптофана Это свойство белков может использоваться в целях их определения. Если буферный раствор, используемый для разведения белка, имеет большую оптическую плотность, относительно плотности воды, в нем присутствует интерферирующее вещество. Эту интерференцию можно устранить, если использовать буферный раствор в качестве раствора сравнения, но, если интерферирующее вещество проявляет высокую оптическую плотность, результаты могут быть подвергнуты сомнению. При низких концентрациях белок может сорбироваться на кювете, что приводит к существенному занижению концентрации его в растворе. Этого можно избежать, подготавливая образцы с высокой концентрацией или используя детергенты неионного характера.

Исследуемый раствор. Необходимое количество исследуемого вещества, растворяют в соответствующем буферном растворе для получения раствора с концентрацией белка в диапазоне от 0,2 мг/мл до 2 мг/мл.

Стандартный раствор. Готовят раствор соответствующего стандартного вещества для определяемого белка с тем же буферным раствором и в той же концентрации, как исследуемый раствор.

Методика. Во время выполнения данного исследования испытуемый раствор, стандартный раствор и раствор сравнения хранят при одинаковой температуре. Определяют оптическую плотность (*2.2.25.*) исследуемого раствора и стандартного раствора в кварцевой кювете при длине волны 280 нм, используя необходимый буферный раствор в качестве раствора сравнения. Результаты исследования должны быть линейными в диапазоне концентраций исследуемого белка.

Обработка полученных результатов. Точность определения белка может быть снижена за счет светорассеивания раствора исследуемого образца. Если белок в растворе существует в виде частиц, сопоставимых по размерам с длиной волны измеряемого света (250 нм – 300 нм), рассеивание светового потока приводит к очевидному увеличению оптической плотности исследуемого образца. Чтобы рассчитать оптическую плотность при длине волны 280 нм с учетом светорассеяния, определяют оптическую плотность исследуемого раствора при следующих длинах волн – 320 нм, 325 нм, 330 нм, 335 нм, 340 нм, 345 нм и 350 нм. Находят логарифмическую функцию полученной оптической плотности к длине волны и по соответствующим точкам строят график линейной регрессии. Экстраполируют данные, снятые с графика, чтобы определить логарифм оптической плотности при длине волны 280 нм. Антилогарифмом данного значения является оптическая плотность, определенная светорассеянием. Для получения оптической плотности белка в растворе корректируют наблюдаемые значения вычитанием оптической плотности, определяемой светорассеянием, из общей оптической плотности, измеренной при длине волны 280 нм. Фильтрование с использованием фильтра 0,2 мкм не поглощающего белок, или осветление центрифугированием, могут применяться для снижения эффекта светорассеяния, особенно в случае явной мутности раствора.

Расчеты. Для расчетов используют откорректированные значения. Рассчитывают концентрацию белка в исследуемом растворе (C_U), используя уравнение:

$$C_U = C_S \frac{A_U}{A_S},$$

где:

C_U – концентрация белка в исследуемом растворе;

C_S – концентрация белка в стандартном растворе;

A_U и A_S – откорректированные значения оптической плотности исследуемого и стандартного раствора, соответственно.

МЕТОД 2

Данный метод (обычно называемый методом Лоури).

Метод основан на образовании окрашенных продуктов ароматических аминокислот с реактивом Фолина в сочетании с биуретовой реакцией на пептидные связи.

Развитие окраски достигает своего максимума через 20-30 мин при комнатной температуре, после чего происходит постепенное обесцвечивание. Поскольку данный метод является чувствительным к интерферирующим веществам, можно использовать процедуру для осаждения белка из исследуемой пробы. Большинство интерферирующих веществ вызывают слабое окрашивание, хотя применение

некоторых детергентов может вызывать усиление цвета. Поскольку различные белки могут давать цветовые реакции различной эффективности, стандартное вещество и исследуемый белок должны быть одинаковыми. В тех случаях, когда необходимо отделение интерферирующих веществ от белка в исследуемой пробе, используют процедуру, описанную ниже для интерферирующих веществ перед тем, как подготовить исследуемый раствор. Эффект интерферирующих веществ может быть минимизирован с помощью разведения, обеспечивающего концентрацию исследуемого белка на уровне, достаточном для проведения точных измерений.

Для приготовления всех буферных растворов и реактивов, применяемых в данном методе используют *воду дистиллированную Р*.

Исследуемый раствор. Достаточное количество исследуемого вещества, растворяют в указанном в частной статье буферном растворе для получения раствора с концентрацией в пределах интервала стандартного графика. При указанном буферном растворе раствор имеет pH от 10,0 до 10,5.

Стандартные растворы. Стандартное вещество, предназначенное для определения белка, растворяют в буферном растворе, используемым для приготовления исследуемого раствора. Данный раствор разводят порционно одинаковым буферным раствором, чтобы получить не менее пяти стандартных растворов с концентрациями белка, равномерно распределенными в интервале между 5 мкг/мл и100 мкг/мл.

Контрольный раствор. Используют буферный раствор, применяемый для приготовления исследуемого раствора и стандартных растворов.

Реактив меди сернокислой. В *дистиллированной воде Р* растворяют 100 мг *меди (II) сульфатаР* и 0,2 г *натрия тартрата Р* в *воде дистиллированной Р* и доводят объем до 50 мл тем же растворителем. Растворяют 10 г *натрия карбоната безводного Р* в *воде дистиллированной Р* и доводят объем до 50 мл тем же растворителем. Медленно вливают раствор натрия карбоната в раствор меди сернокислой, помешивая. Раствор используют в течение 24 часов.

Реактив щелочной меди. Смешивают 1 объем реактива меди сернокислой, 2 объема 50 г/л раствора *натрия додецил сульфата Р* и 1 объем раствора 32 г/л *натрия гидроксида Р*. Хранят при комнатной температуре и используют в течение 2 недель.

Разведенный фосфомолибденовольфрамовый реактив. Смешивают 5 мл *фосфомолибденовольфрамового реактива Р* с 55 мл *воды дистиллированной Р.* Хранят в контейнере темного стекла при комнатной температуре.

Методика. К 1,0 мл каждого стандартного раствора, исследуемого раствора и контрольного раствора прибавляют 1,0 мл реактива щелочной меди и смешивают. Дают отстояться в течение 10 мин. Затем прибавляют 0,5 мл разведенного *фосфомолибденовольфрамового реактива*, смешивают и дают отстояться при комнатной температуре в течение 30 мин. Определяют оптическую плотность (*2.2.25*) раствора при длине волны 750 нм, используя контрольный раствор в качестве раствора сравнения.

Расчеты. Зависимость оптической плотности от концентрации белка не является линейной, тем не менее, если диапазон концентраций, используемый для построения стандартного графика небольшой, он близок к линейности. Строят графическую зависимость оптической плотности стандартных растворов от концентраций белка и используют линейную регрессию для построения стандартного графика. На основании стандартного графика и оптической плотности определяют концентрацию белка в исследуемом растворе.

Интерферирующие субстанции. В представленной процедуре перед началом определения дезоксихолево-трихлоруксусная кислота добавляется в исследуемую пробу для удаления интерферирующих веществ. Данная методика может быть применена для концентрирования белков из разведенного раствора.
Добавляют 0,1 мл раствора 1,5 г/л *натрия дезоксихолата Р* к 1 мл исследуемого вещества. Используя миксер, перемешивают раствор и дают отстояться при

комнатной температуре в течение 10 мин. Добавляют 0,1 мл раствора 720 г/л *трихлоруксусной кислоты Р* и перемешивают миксером. Центрифугируют при ускорении 3000 *g* в течение 30 мин, декантируют и удаляют остаточную жидкость пипеткой. Повторно разводят полученный осадок в 1 мл реактива щелочной меди.

МЕТОД 3

Данный метод (известный как метод Бредфорд) основан на абсорбционном сдвиге с длины волны 470 нм до 595 нм, наблюдаемом при связывании белков красителем кислотным синим 90. Краситель кислотный синий 90 связывает наиболее активно аргининовые и лизиновые остатки в белке, что может приводить к погрешности при исследовании различных белков. Белки, используемые в качестве стандартного вещества, должны быть такими же, как и белки, предназначенные для исследования. Следует избегать детергентов и амфолитов в исследуемом образце. Высоко щелочные пробы могут взаимодействовать с кислотными реагентами.

Для приготовления всех буферных растворов и реактивов, применяемых в данном методе, используют *воду дистиллированную Р*.

Исследуемый раствор. Для получения раствора с концентрацией в пределах интервала стандартного графика растворяют достаточное количество вещества, предназначенного для исследования в указанном в частной статье буферном растворе.

Стандартные растворы. Растворяют стандартное вещество, предназначенное для определения белка в том же буферном растворе, что и исследуемый раствор. Разводят порционно данный раствор этим же буферным раствором, чтобы получить не менее пяти стандартных растворов с концентрациями белка, равномерно распределенными в интервале между 0,1 мг/мл и 1 мг/мл.

Контрольный раствор. Используют буферный раствор, применяемый для приготовления исследуемого раствора и растворов сравнения.

Реактив кислотный синий 90. Разводят 0,10 г *реактива кислотного синего 90 Р* в 50 мл *спирта 96% (об/об) Р*. Добавляют 100 мл *кислоты фосфорной Р*, доводят раствор до 1000 мл *водой дистиллированной Р* и перемешивают. Фильтруют раствор и хранят в контейнере темного стекла при комнатной температуре. При хранении выпадает осадок красителя, поэтому перед использованием реактив необходимо профильтровать.

Методика. Добавляют 5 мл реактива ***кислотного синего 90 Р*** **к 0,100 мл** каждого раствора сравнения, исследуемого и контрольного раствора. Смешивают, избегая образования пены. Определяют оптическую плотность(2.2.25.) стандартных растворов и исследуемого раствора при длине волны 595 нм, используя контрольную пробу в качестве раствора сравнения. Не используют кварцевые (кремниевые) спектрофотометрические кюветы, поскольку краситель связывается с этим материалом.

Расчеты. Зависимость оптической плотности от концентрации белка не является линейной, тем не менее, если диапазон концентраций, используемый для построения стандартного графика небольшой, он близок к линейности. Строят графическую функцию оптической плотности стандартных растворов от концентраций белка и используют линейную регрессию для построения стандартного графика. На основании стандартного графика и оптической плотности определяют концентрацию белка в исследуемом растворе.

МЕТОД 4

Данный метод (известный как метод бицинхонинической кислоты БХК) основывается на восстановлении белком иона двухвалентной меди (Cu^{2+}) в ион одновалентной меди (Cu^{1+}). Реагент бицинхонинической кислоты применяется для определения иона, содержащего одновалентную медь. С реакцией интерферируют несколько веществ. Эффект интерферирующих веществ может быть минимизирован

с помощью разведения, обеспечивающего концентрацию исследуемого белка на уровне, достаточном для проведения точных измерений.

Осаждение белка, описанное в Методе 2, может быть использовано для удаления интерферирующих субстанций. Поскольку различные белки могут давать цветные реакции различной интенсивности, стандартное вещество и исследуемый белок должны быть одинаковыми.

Для приготовления всех буферных растворов и реактивов, применяемых в данном методе, используют *воду дистиллированную Р*.

Исследуемый раствор. Достаточное количество вещества, предназначенного для исследования, растворяют в указанном в частной статье буферном растворе для получения раствора с концентрацией в пределах интервала стандартного графика.

Стандартные растворы. Стандартное вещество, предназначенное для определения белка, растворяют в буферном растворе, используемым при приготовлении исследуемого раствора. Данный раствор разводят порционно этим же буферным раствором, чтобы получить не менее пяти растворов сравнения с концентрациями белка, равномерно распределенными в интервале между 10 мкг/мл и 1200 мкг/мл.

Контрольный раствор. Используют буферный раствор, применяемый для приготовления тестового раствора и стандартных растворов.

БХК реактив. В *воде дистиллированной Р* растворяют 10 г *динатрия бицинхонината Р*, 20 г *натрия карбоната моногидрата Р*, 1,6 г *натрия тартрата Р*, 4 г *натрия гидроксида Р*, и 9,5 г *натрия гидрокарбоната Р.* При необходимости регулируют pH раствора до 11,25 раствором *натрия гидрооксида Р* или раствором *натрия гидрокарбоната Р,* доводят объем до 1000 мл *водой дистиллированной Р* и перемешивают.

Медно-бицинхонинатовый реактив. Смешивают 1 мл раствора 40г/л *меди сульфата Р* и 50 мл БХК реактива.

Методика. Смешивают 0,1 мл каждого стандартного раствора, исследуемого раствора и контрольного раствора с 2 мл медно-бицинхонинатового реактива. Инкубируют раствор при температуре 37°С в течение 30 мин. Засекают время для остывания смеси до комнатной температуры и через 60 мин после окончания инкубирования определяют оптические плотности (*2.2.2*5) стандартных растворов и исследуемого раствора в кварцевых кюветах при длине волны 562 нм, используя контрольный раствор в качестве раствора сравнения. Необходимо учитывать, что после остывания растворов до комнатной температуры, интенсивность цвета постепенно возрастает.

Расчеты. Зависимость оптической плотности от концентрации белка не является линейной, тем не менее, если диапазон концентраций, используемый для построения стандартного графика небольшой, он близок к линейности. Строят графическую функцию оптической плотности стандартных растворов от концентраций белка и используют линейную регрессию для построения стандартного графика. На основании стандартного графика и оптической плотности определяют концентрацию белка в исследуемом растворе.

МЕТОД 5

Данный метод (известный как биуретовый метод) основывается на взаимодействии иона двухвалентной меди (Cu^{2+}) с белком в щелочной среде и образовании цветного окрашивания раствора, оптическая плотность которого измеряется при длине волны 545 нм. Данный метод демонстрирует минимальное различие между равными количествами иммуноглобулиновых и альбуминовых проб. Добавление натрия гидроксида и биуретового реактива в качестве комбинированного реагента, незначительное смешивание после добавления натрия гидроксида или значительный период времени между добавлением натрия гидроксида и добавлением биуретового реактива дает более высокие значения для

иммуноглобулина по сравнению с альбуминовыми образцами. Метод трихлоруксусной кислоты, используемый для минимизации влияния интерферирующих веществ, также может использоваться для определения содержания белка в исследуемых образцах при концентрациях ниже 500 мкг/мл.

Для приготовления всех буферных растворов и реактивов, применяемых в данном методе, используют *воду дистиллированную Р.*

Исследуемый раствор. Достаточное количество исследуемого вещества, растворяют в растворе 9 г/л *натрия хлорида Р* для получения раствора с концентрацией в пределах концентраций стандартных растворов.

Стандартные растворы. В растворе (9 г/л) *натрия хлорида Р* растворяют стандартное вещество для исследуемого белка. Пропорционально разводят этот раствор в растворе 9 г/л *натрия хлорида Р* для получения не менее трех растворов сравнения с концентрацией белка, равномерно распределенной в интервале 0,5 мг/мл – 10 мг/мл.

Контрольный раствор. Используют раствор 9 г/л *натрия хлорида Р*.

Биуретовый реактив. Растворяют 3,46 г *меди сульфата Р* в 10 мл горячей *воды дистиллированной* и охлаждают (Раствор А). Растворяют 34,6 г *натрия цитрата Р* и 20,0 г *натрия карбоната безводного Р* в 80 мл горячей *воды дистиллированной Р* и охлаждают (Раствор В). Смешивают растворы А и В и доводят объем *водой дистиллированной Р* до 200 мл. Используют раствор в течение 6 месяцев. В случае помутнения или выпадения осадка, реактив не подлежит использованию.

Методика. К одному объему исследуемого раствора прибавляют равный объем раствора 60 г/л *натрия гидроксида Р* и перемешивают. Немедленно добавляют биуретовый реактив в количестве равном 0,4 объема исследуемого раствора и быстро смешивают. Выдерживают при комнатной температуре не менее 15 мин. Через 90 мин после добавления биуретового реактива определяют оптическую плотность (*2.2.25*) растворов сравнения и исследуемого раствора при длине волны 545 нм, используя в качестве раствора сравнения контрольный раствор. Мутные растворы или растворы с осадком не пригодны для расчета концентрации белка.

Расчеты. Зависимость оптической плотности от концентрации белка имеет приблизительно линейный характер в рамках указанного интервала концентрации белка для стандартных растворов. Строят график зависимости оптических плотностей стандартных растворов от концентраций белка и используют линейную регрессию для формирования стандартного графика. Рассчитывают коэффициент корреляции для стандартного графика. Система считается пригодной, если линейная зависимость имеет коэффициент не менее 0,99. На основании стандартного графика и оптической плотности исследуемого раствора определяют концентрацию белка в исследуемом растворе.

Интерферирующие вещества. Для минимизации эффекта интерферирующих веществ белок может быть преципитирован из исследуемой пробы следующим образом: добавляют 0,1 объема раствора 500 г/л *кислоты трихлоруксусной Р* к 1 объему раствора исследуемого образца, удаляют всплывающий слой и разводят преципитат в небольшом объеме *0,5 М раствора натрия гидроксида Р*. Используют полученный раствор для приготовления исследуемого раствора.

МЕТОД 6

Данный флюориметрический метод основан на дериватизации белка *о*-фталальдегидом, который в первую очередь взаимодействует с аминами белка (*N*-терминальная аминокислота и ε-аминогруппа лизиновых остатков). Чувствительность анализа может быть повышена гидролизом белка перед добавлением *о*-фталальдегида. Гидролиз делает α-аминогруппу аминокислот, входящих в структуру белка, доступной для реакции с фталальдегидным реактивом.

Данный метод требует минимального содержания белка. Первичные амины как, например, трис(гидроксиметил)аминометан и аминокислотные буферные растворы взаимодействуют с фталальдегидом, вследствие чего их следует удалять. Аммоний при высоких концентрациях взаимодействует с фталальдегидом. Флюоресценция, полученная при взаимодействии амина с фталальдегидом, может быть нестабильной. Использование автоматизированных процедур для стандартизации данного метода может повысить качество и точность данного метода.

Для приготовления всех буферных растворов и реагентов, применяемых в данном методе, используют *воду дистиллированную Р*.

Исследуемый раствор. Растворяют достаточное количество исследуемого вещества, в растворе 9 г/л *натрия хлорида Р* для получения раствора с концентрацией в пределах концентраций стандартных растворов. Перед добавлением фталалдегидного реактива устанавливают pH раствора от 8 до 10,5.

Стандартные растворы. Стандартное вещество исследуемого белка, растворяют в растворе 9 г/л *натрия хлорида Р*. Пропорционально разводят этот раствор в растворе 9 г/л *натрия хлорида Р* для получения не менее пяти растворов сравнения с концентрацией белка, равномерно распределенной в интервале 10 мкг/мл-200 мкг/мл. Перед добавлением фталалдегидного реактива устанавливают pH раствора от 8 до 10,5.

Контрольный раствор. Используют раствор 9 г/л *натрия хлорида Р*.

Боратный буферный раствор. Растворяют 61,83 г *кислоты борной Р* в *воде дистиллированнойР* и устанавливают pH 10,4 при помощи раствора *калия гидроокиси Р*. Доводят раствор до 1000 мл *водой дистиллированной Р* и перемешивают его.

Фталальдегидный основной раствор. Растворяют 1,20 г *фталальдегида Р* в 1,5 мл *метанола Р*, добавляют 100 мл боратного буферного раствора и перемешивают. Добавляют 0,6 мл раствора 300 г/л *макрогол 23 лаурилового эфира Р* и перемешивают. Хранят при комнатной температуре и используют в течение 3-х недель.

Фталальдегидный реактив. К 5 мл фталальдегидного основного раствора добавляют 15 мкл *2-меркаптоэтанола Р*. Раствор готовят не менее, чем за 30 мин до начала использования. Хранят в течение 24 ч.

Методика. Смешивают 10 мкл исследуемого раствора и каждого из стандартных растворов с 0,1 мл фталальдегидного реактива и выдерживают при комнатной температуре 15 мин. Прибавляют 3 мл *0,5 М раствора натрия гидроксида Р* и смешивают. Определяют флюоресценцию (*2.2.21.*) стандартных растворов и исследуемого раствора при активированной длине волны 340 нм и эмиссионной длине волны от 440 до 455 нм. Измеряют флюоресценцию данных растворов единожды, поскольку излучение снижает интенсивность флюоресценции.

Расчеты. Зависимость флюоресценции от концентрации белка имеет линейный характер. Строят график зависимости флюоресцентной интенсивности стандартных растворов от концентрации белка и используют линейную регрессию для формирования стандартного графика. На основании графика и флюоресцентной интенсивности стандартного раствора определяют концентрацию белка в исследуемом растворе.

МЕТОД 7

Данный метод основывается на определении содержания азота, как способе определения белка. Интерференция, вызванная присутствием других азотсодержащих веществ в исследуемом образце, может влиять на определение белка при помощи данного метода. Техника азотного анализа основана на разрушении исследуемого образца.

Методика А. Выполняется в соответствии с описанной в частной статье процедурой для определения азота минерализацией серной кислотой (*2.5.9*) или при помощи прибора для определения азота по Кьельдалю.

Методика B. Анализ может выполняться при помощи приборов. Большинство приборов, применяемых для азотного анализа, используют пиролиз (сжигание образца в токе кислорода при температуре близкой к 1000°C). При этом выделяется оксид азота (NO) и другие оксиды азота (NO_x) из азота, присутствующего в исследуемых веществах. В некоторых приборах окись азота преобразуется в азот, который измеряется теплопроводным детектором. В других приборах оксид азота (NO) смешивается с озоном (O_3), образуя при этом активированный диоксид азота (NO_2^*), который испускает свет при распаде и может быть измерен хемилюминесцентным детектором. Стандартный образец белка, который относительно чист и схож по своему составу с исследуемыми белками, используется для оптимизации параметров пиролиза и оценки последовательности анализа.

Расчеты. Содержание белка рассчитывается делением содержания азота в исследуемом образце на известное содержание азота в белке. Известное содержание азота в белке можно определить на основе химического состава белка или сравнения с подходящим стандартным образцом.

2.5.34. УКСУСНАЯ КИСЛОТА В СИНТЕТИЧЕСКИХ ПЕПТИДАХ

Исследование проводят методом жидкостной хроматографии (*2.2.29*).

Исследуемый раствор. Готовят исследуемый раствор, как указано в частной статье.

Стандартный раствор. Готовят раствор 0,10 г/л *кислоты уксусной ледяной Р* в смеси с 5 объемами мобильной фазы B и 95 объемами мобильной фазы A.

Хроматографическая процедура может проводиться с использованием:

— колонок из нержавеющей стали длиной 0,25 м и 4,6 мм внутреннего диаметра с неподвижной фызой *октадецилсилил силикагелем для хроматографии Р (*5 мкм);

— скорость потока мобильной фазы 1,2 мл/мин;

— м*обильная фаза A:* разводят 0,7 мл *кислоты фосфорной Р* до 1000 мл *водой Р,* корректируют pH до 3,0 концентрированным *раствором натрия гидроксида Р;*

— м*обильная фаза B:* м*етанол R2*

Время (мин)	**Мобильная фаза A (% *об/об*)**	**Мобильная фаза B (% *об/об*)**
0 - 5	95	5
5 - 10	95 → 50	5 → 50
10 - 20	50	50
20 - 22	50 → 95	50 → 5
22 - 30	95	5

— спектрофотометрический детектор с длиной волны 210 нм.

Вводят 10 мкл стандартного раствора и 10 мкл исследуемого раствора. В полученных хроматограммах пик, соответствующий уксусной кислоте, имеет время удерживания 3-4 мин. Основная линия представляет собой крутой пик в начале линейного градиента, который соответствует элюированию пептидов из колонки. Определяют содержание уксусной кислоты в пептиде.

2.5.35. ТИТРОВАНИЕ В НЕВОДНЫХ РАСТВОРИТЕЛЯХ

Метод кислотно-основного титрования в неводных растворителях применяется для количественного определения веществ, представляющих собой кислоты, основания или соли, титрование которых в воде затруднено или невозможно из-за слабых кислотно-основных свойств или малой растворимости.

В неводных растворителях резко изменяются кислотно-основные свойства различных веществ. В зависимости от растворителя одно и то же вещество может быть кислотой, основанием или вообще не проявлять кислотно-основных свойств. Применение различных растворителей позволяет управлять кислотно-основными свойствами веществ.

Выбор растворителя осуществляется на основании величин констант титрования K_T или их отрицательных логарифмов pK_T. Величина pK_T является критерием возможности и точности титрования. Чем больше эта величина, тем лучше условия титрования. Константа титрования определяется двумя основными величинами: константой кислотности титруемой кислоты (K_a), или константой кислотности кислоты, сопряженной с титруемым основанием (K_{BH^+}), и константой автопротолиза растворителя (K_{SH}).

При титровании кислот:

$$K_T = \frac{K_{SH}}{K_a} \text{ или } pK_T = pK_{SH} - pK_a;$$

При титровании оснований:

$$K_T = K_{BH^+} \text{ или } pK_T = pK_{BH^+};$$

При титровании смеси двух кислот:

$$K_T = \frac{K_{a(2)}}{K_{a(1)}} \text{ или } pK_T = pK_{a(2)} - pK_{a(1)};$$

При титрования смеси двух оснований:

$$K_T = \frac{K_{BH^+(1)}}{K_{BH^+(2)}} \text{ или } pK_T = pK_{BH^+(1)} - pK_{BH^+(2)}.$$

Индекс 1 относится к более сильной кислоте (основанию), а индекс 2 – к более слабой кислоте (основанию).

Значения величин pK_{SH} для ряда растворителей и pK_a кислот и pK_{BH^+} оснований в воде и различных неводных растворителях приведены в таблицах 2.5.14.-2, 2.5.14.-3, 2.5.14.-4. Эти таблицы позволяют быстро определять pK_T. Задачу выбора растворителя помогает решить также линейная зависимость pK_T кислот и оснований, принадлежащих к одной группе химических соединений, в воде и неводных растворителях. Это позволяет определять pK_T кислот и оснований в неводных растворителях, если известны их pK_T в воде.

Как кислоты можно титровать: карбоновые кислоты, фенолы, барбитураты, сульфамиды, аминокислоты и другие.

Как основания можно титровать: амины, азотсодержащие гетероциклические соединения, амиды, четвертичные аммониевые основания и другие.

Оптимальные условия титрования для слабых кислот достигаются в основных неводных растворителях, таких как пиридин, диметилформамид; для слабых оснований – в кислотных неводных растворителях, таких как уксусная кислота и уксусный ангидрид.

Соли некоторых органических и минеральных кислот могут быть оттитрованы как основания в кислотных растворителях.

В случае титрования солей галогеноводородных кислот перед титрованием прибавляют обычно раствор ртути (II) ацетата для связывания галогенид-ионов в малодиссоциирующие соединения. При использовании уксусного ангидрида в качестве растворителя возможно титрование солей галогенводородных кислот, преимущественно хлоридов, без прибавления ртути (II) ацетата.

Для раздельного титрования смесей кислот или смесей оснований используют дифференциирующие растворители, т.е. растворители с величиной рK_{SH}, обычно превышающей 15, не обладающие выраженными кислотно-основными свойствами, такие как кетоны, нитрилы, нитрометан.

В ряде случаев для титрования применяют смеси неводных растворителей, один из которых является апротонным (бензол, хлороформ и др.). Присутствие апротонного растворителя уменьшает константу автопротолиза среды (K_i), что может способствовать улучшению условий титрования.

Метод неводного титрования применяют также для количественного определения веществ, содержащих карбонильную группу, обладающих слабо выраженными кислотно-основными свойствами и не поддающихся прямому титрованию в неводных растворителях. В этом случае проводят реакцию оксимирования в неводных растворителях и осуществляют количественное определение карбонилсодержащих веществ путем титрования избытка реагента. Метод применяют для количественного определения различных классов органических соединений: альдегидов, кетонов, хромонов, стероидных гормонов, гликозидов и др.

Титрование в неводных средах может быть проведено как с индикаторами, так и потенциометрически с использованием в качестве индикаторного стеклянного или других, обратимых к протону электродов. В качестве электрода сравнения обычно используют хлоридсеребряный электрод.

При проведении потенциометрического титрования в неводных средах электролитический мост или электрод сравнения заполняют растворами калия хлорида или лития хлорида в соответствующих неводных растворителях.

При титровании в основных растворителях следует принимать меры для защиты испытуемого раствора и титрованного раствора от углерода диоксида, содержащегося в воздухе. Титрование лучше проводить в атмосфере инертного газа (азота, гелия).

В Табл. 2.5.14.-1 приведены наиболее часто применяемые неводные растворители, индикаторы и титранты.

Таблица 2.5.14.-1

Растворители, индикаторы и титранты, наиболее часто применяемые в неводном титровании

Растворители	Индикаторы	Титранты
Кислотные Уксусная и муравьиная кислоты, уксусный ангидрид и их смеси с другими растворителями	Кристаллический фиолетовый, судан III, тропеолин 00, метиловый фиолетовый, нейтральный красный, малахитовый зеленый, диметиламиноазобензол	Раствор хлорной кислоты в уксусной кислоте или в нитрометане
Основные Диметилформамид, пиридин, этилендиамин	Тимоловый синий, бромтимоловый синий, α-нафтолбензеин, ортонитроанилин	Растворы натрия гидроксида, калия гидроксида, натрия метилата, лития метилата, тетраэтиламмония гидроксида в метаноле или смеси метанола и бензола
Дифференцирующие Ацетон, диоксан, нитрометан, метилэтилкетон, метанол, изопропанол, третбутанол, диметилсульфоксид	Метиловый оранжевый, тимоловый синий, нейтральный красный, метиловый красный, бромтимоловый синий	Растворы кислоты хлористоводородной в метаноле или в гликолевых смесях; растворы кислоты хлорной в нитрометане, в метаноле или в гликолевых смесях; растворы, применяемые при титровании в основных растворителях

Таблица 2.5.14.-2

Величины pK_{SH} различных растворителей ($pK_{SH} = –lgK_{SH}$) при температуре от 20°C до 25°C

	Растворитель	pK_i
1	Серная кислота	3,62
2	Муравьиная кислота	6,10
3	Уксусная кислота	14,4
4	Уксусный ангидрид	14,5
5	Этилендиамин	15,3
6	Этиленгликоль	15,6
7	Формамид	16,7
8	Метанол	16,7
9	Пропиленгликоль	16,8
10	Диэтиленгликоль	17,5
11	Этанол	19,1
12	Масляная кислота	19,2
13	н-Бутанол	20,1
14	Метилцеллозольв	20,7
15	Изопропанол	22,0
16	Диметилацетамид	23,9
17	Нитрометан	24,0
18	N-Метилпирролидон	24,2
19	Пиридин	24.2
20	Диметилсульфоксид 97% (*)	24,5
21	Диметилформамид	25.3
22	Метилбутилкетон	25,3
23	Сульфолан	25,5
24	Метилэтилкетон	25,7
25	Ацетон	25,9
26	Ацетон 90% (*)	20,3
27	трет-Бутанол	26,8
28	Пропиленкарбонат	29,2
29	Жидкий аммиак	29,8
30	Ацетонитрил	32,2
31	Диметилсульфоксид	33,3

(*) – другой компонент – вода

Кислота	**Растворитель**													
	Вода	**Метанол**	**Спирт 95 %**	**Бутанол**	**Изопропанол**	**трет-Бутанол**	**Этиленгликоль**	**Пропиленгликоль**	**Метилцеллозольв**	**Ацетон**	**Ацетон 90 %**	**Метилизобутилкетон**	**Метилэтилкетон**	**Формамид**
Хлорная						3.94				2.90			2.20	
Серная		1.44		3.42									5.48	
Азотная	0.2	3.17	3.75										4.66	
Хлороводородная	0,8	1,05	1,95		3,10	5,50				8,90	2,47		8,30	
Бромоводородная	0.2				2.0	5,0								
п-Толуолсульфоновая						3.82								
Уксусная	4.75	9.70	10.41	10.3	11.3	14.2	8.3	9.10	11.1	12.5	10.27		16.6	6.91
Монохлоруксусна	2.86	7.80	8.51	8.50	9.23	12.2	6.0		9.10	11.20	7.60		15.4	4.50
Дихлоруксусная	1.31	6.30	7.14	7.30	7.80	10.2	4.5			10.2			10.26	
Трихлоруксусная	0,70	4,90	5,70	6,30					5,90	8,20			8,86	1,46
Фенилуксусная	4.31						8.0	8.78						6.57
Муравьиная	3.75		9.15			8.82			9.70				16.70	5.74
Бензойная	4.20	9.52	10.13	10.2		15.1	8.1	8.83	10.7	11.95	9.70		16.6	6.36
п-	3,40	8,40	8,87	9,10	9,60	12,0				10,5	8,09			5,88
м-	3.46	8.30	9,0	9.15		9.20				10.6	8.03			5.40
п-	4.92													
3,5-Динитробензойная	2.80				8.31	10.6				9.63		18.80	9.78	
Салициловая	2.89	7.90	8.60	7.73		9.53			8.90	9.53	7.22		13.0	4.73
Ацетилсалицилов	3.50												16.30	
Никотиновая	4.73									16.6			15.0	
Барбитуровая	4.01													
Винная	3,03	7,40												
Лимонная	3.10												10.1	
Фенол	9.89	14.2				19.0							22.3	
Резорцин	9.20													
о- Нитрофенол	7.17									13.82	10.7			
п-Нитрофенол	17.1	11.0	11.0		11.1	14.4				13.5	10.93			8.53
м-Нитрофенол	8.30				12.6									
2,4-	4,02	7,85	8,21	8,36		10,68				8,76	6,45		9,31	4,52
2,5-Динитрофенол	5,22	8,98									8,10			5,94
2,6-	3.71	7.63									6.77	17.60		4.17
3,5-	6.70				10.8	13.4								
Пикриновая	0.80	4.80	3.93	4.50	3.70	3.65				3.17	2.18	11.O	3.70	1.33
Барбитал	7,43	12,6				16,8							19,0	
Фенобарбитал	7.21									19.2			13.30	
Сульфадимезин	7.51									19.6			18.70	
Сульфадиметокси	5.90													
Сульфамеразин	7,10													
Норсульфазол	6.80													
Сульгин	13.0													
Метилурацил	9,70													
Фторурацил	7.98													
Тиоурацил	7.82													
Цинхофен	6.22													
Рутин	8.96	[10.3								13.15				
Кверцетин	8.21	9.18								14.41				
Дикуразид	9.49	12.3								14.3				
Изосалипурпозид	7.67	11.6								12.9				
Неодикумарин	4.37	5.71								7.37				
Зоокумарин	4,70	9,63								7,81				

растворителях (pK_A = *-lg KA*

Растворитель													
Диметилформамид	**Диметилсульфоксид**	**Диметилсульфоксид 97 %**	**Диметилацетамид**	**Пропиленкарбонат**	**Ацетонитрил**	**Нитрометан**	**N-метилпирролидон**	**Пиридин**	**Жидкий аммиак**	**Уксусная кислота**	**Муравьиная кислота**	**Масляная кислота**	**Уксусный ангидрид**
				5,34	1,90	2,23		3,23	2,27	2,70	0,28	12,1	0,90
3,10					4,60	5,10				4,25	0,58		4,90
						8,80		4,30	2,37	5,10		14,2	8,20
				7,77	6,20	8,10	4,08	5,40	2,89	5,30	0,89	13,3	8,30
1,80					5,51			4,36					4,90
1,55					5,30			2,68			0,34	12,90	
13,50	12,60		12,60	18,81	22,30	20,50	13,30	11,44	4,11				
10,10	8,90		8,75	16,55	18,80	17,0	10,90						
					15,80	14,10	8,30						
10,60				11,30									
12,90	11,60					20,10							
11,55				17,09			12,0	8,84					
12,20	11,10		11,0	19,67	20,70	19,60	12,30	9,80					
10,60	9,0				18,70	17,60	10,50	7,94					
10,82	9,20				19,29	17,60	10,70	8,16					
		10,20											
8,95	7,40				16,90								
8,30	6,80	8,34	6,90	15,23	16,70								
11,30													
10,80	9,60	9,60											
		12,32						6,67					
8,90													
10,60													
18,0	16,40	15,62			26,60	25,70	17,60	16,20					
		14,73											
12,14	11,0				22,0	21,40	12,60	10,03					
11,83	11,0			19,71	20,80	20,10	12,50	9,60					
				21,24			22	23	24	25	26	27	28
6,36	5,20			14,87	16,0	15,90	6,80	4,38					
8,78				16,45	17,50	17,9		5,76					
6,18	4,90				16,8	16,0							
11,42	10,60				20,50	19,40							
3,65	1,0			9,90	11,0	10,50		3,65					
	13,0	11,15			23,4								
13,40	10,98	10,9											
13,0		11,0											
		7,47											
		7,43											
		11,22											
		18,05											
15,30	13,0												
12,40	10,1												
12,20	10,8												
		11,28											
11,12	12,1												
11,22	11,63												
13,15	13,28												
11,83	12,20												
5,75	6,23												
8,45	9,90												

Величины $pK_{BH}{}^{+}$ оснований в разных

Основание	Растворитель									
	Вода	**Метанол**	Этанол 95 %	**Етилен-гликоль**	**Пропилен гликоль**	**Метилце-ллозольв**	**N-метил-пирроли-дон**	**Муравьи-ная кислота**	**Уксусна якислота**	**Уксусн. ангид-рид**
Тетраметилгуанидин	13,60									
Гуанозин	12,40					15,0				
Пиперидин	11,20	11,0	12,51	12,52	11,71		10,40		10,1	
Диэтиламин	10,90					12,20	9,20	5,19	10,10	
Бензиламин	9,62					11,30				
Цитидин	9,80					13,20				
Аденин	9,90					13,70				
Трибутиламин	9,85								10,10	
Триэтиламин	10,70			11,15	10,87		8,70		10,20	11,50
Диметиламин	10,60								10,0	
н-Бутиламин	10,60									
Аденозин	10,55					14,90				
Дифенилгуанидин	10,10	13,60	15,26				8,90		10,0	
Аммиак	9,30					11,70			10,10	
Анилин	4,58	6,10	5,70	6,12	6,12			5,49	8,60	
Диметиланилин	5,10	4,50	4,40						9,93	
Диэтиланилин	6,52								10,20	10,60
п-Хлоранилин	4,00		4,66						9,27	
м-Хлоранилин	3,52		4,35						9,25	
о-Нитроанилин	0,29								6,95	
м-Нитроанилин	2,50		4,25						6,70	
п-Нитроанилин	1,02	1,29	1,01							
Пиридин	5,15	5,54	4,30	5,92	5,69			5,50	10,0	9,90
п-Толуидин	5,07	6,60	6,30							
м-Толуидин	4,71	3,20	5,90							
α-Пиколин	5,95	6,24	5,54	6,38	6,09					
α-Нафтиламин	3,92	5,66	5,10					5,05	9,60	
Дифениламин	0,90	3,18							7,45	
Ацетамид	0,48								6,75	8,60
Ацетоксим	1,81								8,42	
Тиомочевина	0,96								7,75	
Эфедрин	9,70			11,29						8,90
Атропин	9,60									11,30
Цитозин	9,40					12,50				
Новокаин	8,80									11,30
Промедол	8,40									11,30
Морфолин	8,70			10,14	9,19					
Тебаин	8,30									
Димедрол	8,20									
Платифилин	8,10									11,50
Кодеин	8,00	8,60	11,40	9,38				5,11		10,80
Морфин	7,80	8,60		9,51				5,08		
Гидразин	8,11					11,10				
Хинин	8,00			5,23						11,50
Бруцин	7,96									
Этилморфин	7,90									11,10
Спазмолитин	7,70									11,60
Пилокарпин	6,80									10,90
Резерпин	6,60									9,54
Наркотин	6,20	7,20								
Гидроксиламин	5,97					9,00				
Папаверин	5,90	6,92		7,25						10,80
Тифен	6,30									11,30
Уротропин (гексаметилентетрамин)	4,90								9,70	7,00
Хинолин	4,80		4,58	5,39	5,27				9,86	
Амидопирин	4,80									9,13
Дибазол	4,20									9,00
Акридин	4,11									
Теофилин	2,60									6,60
Фенацетин	2,20									6,00

Антипирин	1,51								8,35	9,60
Кофеин	0,60							5,17		6,30
Теобромин	0,10							5,26		6,10
Мочевина	0,20							4,67	7,65	9,36
Ацетанилид	0,40								6,80	7,30

растворителях ($pK_{BH^+} = pK_{SH} - pK_B = pK_T$) Таблица 2.5.14.-4

Растворитель								
Ацетон	**Метил-этил-кетон**	**Метил-изо-бутил-кетон**	**Формамид**	**Диметил-формамид**	**Диметил-сульфо-ксид**	**Пропиленк арбонат**	**Нитро-метан**	**Аце-тони-трил**
		20,30		13,65	13,20			23,3
12,24	13,48		11,08	10,40		18,53	18,22	18,92
	13,44			10,10	10,50	18,69	17,95	18,70
							17,77	18,10
11,62	12,40		9,99	9,25	9,0	17,91	18,35	18,46
				10,40			17,96	18,73
				10,50	11,10		16,86	18,26
		15,90		8,90		17,00	17,20	17,90
				9,45	10,50	15,90	15,70	16,46
5,92		9,63	4,10	4,36	3,60	10,56	9,07	10,56
4,91	6,20				2,51	11,15	11,04	
6,26	7,20					12,08		
5,34			3,26				7,99	
4,85		8,40	2,75				7,74	
3,97		7,40					6,62	
3,52							5,18	
5,77	6,94		4,43	3,30	3,40	11,92	12,16	19,33
6,57	6,81		5,81			10,90	9,80	11,25
6,15							9,70	
6,64								
5,42	6,38					9,71		
3,87							5,24	
				9,50				
				8,60				
	14,40			8,20				
16,61				15,18	16,61		15,80	
	11,01							
				7,70				
9,62	11,18			8,30				
9,57				8,30				
				8,75				
		12,90						
	13,60			7,00				
8,10	8,30							
8,03				6,60				
	13,40							
	9,80							

5,41							11,40	
_ 9,30	6,20							
				6,40				
	3,20							
	6,04							

2.6. БИОЛОГИЧЕСКИЕ ИСПЫТАНИЯ

2.6.1. СТЕРИЛЬНОСТЬ

Испытание применяется для субстанций, лекарственных средств или изделий, которые, в соответствии с Фармакопеей, должны быть стерильны. Однако, удовлетворительный результат показывает лишь то, что в условиях испытания в тестируемом образце не обнаружено микроорганизмов. Руководство по использованию испытания на стерильность приводится в конце раздела.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРОТИВ МИКРОБНОЙ КОНТАМИНАЦИИ

Испытание на стерильность выполняют в асептических условиях. Для достижения таких условий обстановка, в которой выполняется испытание, должна быть адаптирована к способу его проведения. Меры предосторожности, принимаемые против контаминации, не должны влиять ни на один из микроорганизмов, обнаруживаемых в ходе испытания. Рабочие условия, в которых выполняется испытание, регулярно контролируются путем отбора проб воздуха и поверхностей рабочей зоны, а также проведением соответствующих контрольных испытаний.

ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ И ТЕМПЕРАТУРЫ ИНКУБАЦИИ

Среды для проведения испытаний могут быть приготовлены в соответствии с приведенными ниже указаниями; также могут использоваться эквивалентные коммерчески доступные среды, при условии, что они выдерживают испытания на питательные свойства.

Показано, что следующие питательные среды являются подходящими для испытания на стерильность. Жидкая тиогликолевая среда предназначена в первую очередь для культивирования анаэробных бактерий, но также обнаруживает и аэробные бактерии. Среда на основе гидролизатов соевых бобов и казеина # и среда Сабуро подходит для культивирования как грибов, так и аэробных бактерий.

Могут быть использованы также и другие среды, при условии их соответствия требованиям испытаний на пригодность.

Жидкая тиогликолевая среда.

L-цистин	0,5 г
Гранулированный агар (избыточное содержание влаги составляет не более 15%)	0,75 г
Натрия хлорид	2,5 г
Глюкозы моногидрат / Безводная глюкоза	5,5 / 5,0 г
Дрожжевой экстракт (водорастворимый)	5,0 г
Панкреатический гидролизат казеина	15,0 г
Натрия тиогликолят или	0,5 г
Тиогликолевая кислота	0,3 мл
Раствор резазурина натриевой соли (1 г/л) свежеприготовленный	1,0 мл
Вода	1000 мл

pH среды после стерилизации 7,1±0,2

Смешивают L-цистин, агар, натрия хлорид, глюкозу, водорастворимый дрожжевой экстракт и панкреатический гидролизат казеина с 1000 мл воды и нагревают до получения раствора. Натрия тиогликолят или тиогликолевую кислоту растворяют в полученной смеси и, при необходимости, добавляют 1 М раствор гидроксида натрия так, чтобы после стерилизации значение pH раствора составляло 7,1±0,2. Если необходима фильтрация, раствор снова нагревают, не доводя до кипения, и фильтруют в горячем виде через увлажненную фильтровальную бумагу. Добавляют раствор резазурина натриевой соли, перемешивают и помещают среду в подходящие сосуды, которые обеспечивают такое отношение поверхности к глубине среды, чтобы изменению окраски, указывающему на поглощение кислорода в конце периода инкубирования, был подвержен только верхний слой, составляющий не более трети от общего объема среды. Стерилизуют с использованием процесса с подтвержденной эффективностью. Среду хранят при температуре 2–25^{0}С в стерильном герметичном контейнере. Если верхний слой, составляющий не более трети от общего объема среды, приобретает розовую окраску, среду можно однократно регенерировать путем нагрева контейнеров на водяной бане или в струе пара до исчезновения розовой окраски с последующим быстрым охлаждением; при этом должны быть приняты меры предосторожности против попадания в контейнер нестерильного воздуха. Среду не используют по истечении валидированных сроков хранения.

Жидкую тиогликолевую среду инкубируют при температуре 30-35^{0}С.

Среда на основе гидролизатов соевых бобов и казеина

Панкреатический гидролизат казеина	17,0 г
Папаиновый гидролизат сои	3,0 г
Натрия хлорид	5,0 г
Калия гидрофосфат	2,5 г
Глюкозы моногидрат / Безводная глюкоза	2,5 г / 2,3 г
Вода	1000 мл

pH среды после стерилизации 7,3±0,2

Твердые компоненты растворяют в воде, слегка нагревая для получения раствора. Раствор охлаждают до комнатной температуры. При необходимости добавляют 1 М раствор гидроксида натрия так, чтобы после стерилизации значение pH раствора составляло 7,3±0,2. При необходимости устранения мутности раствор фильтруют, разливают по подходящим сосудам и стерилизуют с использованием процесса с подтвержденной эффективностью. Если среда не подлежит немедленному использованию, ее хранят при температуре 2–25^{0}С в стерильном герметичном контейнере. Среду не используют по истечении валидированных сроков хранения.

Среду на основе гидролизатов соевых бобов и казеина инкубируют при температуре 20-25^{0}С.

Допускается использование среды Сабуро.

Пептон ферментативный	10,0 г
Глюкоза	40,0 г
Вода	до 1000 мл

pH после стерилизации 5,6 ± 0,2

Среду Сабуро инкубируют при температуре 20-25^{0}С.

Используемая среда должна выдерживать следующие испытания, проводимые для каждой партии до или одновременно с испытанием тестируемой продукции.

Стерильность. Порции среды инкубируют в течение 14 дней. Роста микроорганизмов наблюдаться не должно.

Питательные свойства в отношении аэробов, анаэробов и грибов. Проверке подвергают каждую партию готовой среды, и каждую партию среды, приготовленной из обезвоженных составов или из ингредиентов. Подходящие штаммы микроорганизмов приведены в Таблице *2.6.1.-1*.

Порции жидкой тиогликолевой среды засевают небольшим количеством (не более 100 колониеобразующих единиц) следующих микроорганизмов: *Clostridium sporogenes, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus*. Для каждого из штаммов используют отдельную порцию среды. Порции среды на основе гидролизатов соевых бобов и казеина (# или среды Сабуро) засевают небольшим количеством (не более 100 колониеобразующих единиц) следующих микроорганизмов: *Aspergillus niger, Bacillus subtilis, Candida albicans*. Для каждого из штаммов используют отдельную порцию среды. Инкубируют в течение не более 3 дней в случае бактерий и не более 5 дней в случае грибов.

При получении рабочей культуры, используемой при проведении испытания, число пересевов, произведенных от исходного штамма, не должно превышать пяти.

Среды являются пригодными при условии наличия четкого визуально наблюдаемого роста микроорганизмов.

Таблица 2.6.1.-1

Штаммы тест-микроорганизмов, пригодные для испытаний питательных сред

Аэробные бактерии	
Staphylococcus aureus	АТСС 6538, CIP 4.83, NCTC 10788, NCIMB 9518, #ТСС 6538-Р
Bacillus subtilis	АТСС 6633, CIP 52.62, NCIMB 8054
Pseudomonas aeruginosa	АТСС 9027, NCIMB 8626, CIP 82.118
Анаэробные бактерии	
Clostridium sporogenes	АТСС 19404, CIP 79.3, NCTC 532, АТСС 11437, # ГИСК 272
Грибы	
Candida albicans	АТСС 10231, IP 48.72, NCPF 3179, # АТСС 885-653
Aspergillus niger	АТСС 16404, IP 1431.83, IMI 149007, # ВКМ F-1119

ПРОВЕРКА ПРИГОДНОСТИ МЕТОДИКИ ИСПЫТАНИЯ

Проверку методики испытания выполняют в соответствии с нижеприведенным описанием теста на стерильность испытуемого продукта с использованием в точности аналогичного метода со следующими модификациями.

Мембранная фильтрация. После переноса содержимого испытуемого контейнера или контейнеров на мембрану заключительную порцию стерильного растворителя, используемого для промывки фильтра, инокулируют небольшим коли-

чеством жизнеспособных микроорганизмов (не более 100 колониеобразующих единиц).

Прямая инокуляция. После внесения в питательную среду содержимого испытуемого контейнера или контейнеров ту же среду инокулируют небольшим количеством жизнеспособных микроорганизмов (не более 100 колониеобразующих единиц).

В обоих случаях используют штаммы микроорганизмов, приведенные выше, в описании испытания питательных свойств в отношении аэробов, анаэробов и грибов. За положительный контроль принимают результаты испытания питательных свойств используемых сред. Все контейнеры, содержащие среду, инкубируют не более 5 дней.

Если после периода инкубации ясно наблюдается рост микроорганизмов, визуально сравнимый с ростом в контрольном сосуде, не содержащим испытуемого продукта, делают вывод, что либо продукт в условиях испытания не обладает антимикробной активностью, либо такая активность была в достаточной степени исключена. В таком случае испытание на стерильность может проводиться без дальнейших модификаций.

Если после периода инкубации не наблюдается роста микроорганизмов, визуально сравнимого с ростом в контрольном сосуде, не содержащим испытуемого продукта, делают вывод, что продукт обладает антимикробной активностью, которая в условиях испытания не была в достаточной степени исключена. Условия подвергают модификациям с целью исключения антимикробной активности и повторяют испытание на пригодность.

Это испытание следует проводить в следующих случаях:

а) когда проводится испытание на стерильность новой продукции,

б) при внесении любых изменений в экспериментальные условия испытания.

Проверка пригодности может выполняться одновременно с контролем стерильности испытуемой продукции.

Частные фармакопейные статьи должны содержать сведения о наличии антимикробного действия продукта и рекомендации по его устранению.

ИСПЫТАНИЕ НА СТЕРИЛЬНОСТЬ ТЕСТИРУЕМОГО ПРОДУКТА

Испытание может быть выполнено с использованием метода мембранной фильтрации или путем прямой инокуляции питательной среды испытуемым продуктом. Должны проводиться соответствующие отрицательные контрольные опыты. В тех случаях, когда позволяет природа продукта (фильтруемые водные препараты, спиртовые или масляные препараты, а также препараты, смешиваемые или растворимые в водных или масляных растворителях, не обладающих антимикробным эффектом в условиях испытания), следует предпочитать метод мембранной фильтрации.

Мембранная фильтрация. Используют мембранные фильтры с номинальным размером пор, не превышающим 0,45 мкм, с установленной способностью к удерживанию бактерий. Например, фильтры на основе нитрата целлюлозы используют для водных, масляных и разбавленных спиртовых растворов, а фильтры на основе ацетата целлюлозы – в частности, для растворов с высоким содержанием спирта. Для некоторых видов продукции, например, для антибиотиков, могут потребоваться специально подготовленные фильтры.

В нижеописанном методе предполагается использование мембран диаметром около 50 мм. При использовании фильтров других диаметров объемы разведений и промывок должны быть изменены соответствующим образом. Аппарат для фильтрации и мембрану стерилизуют подходящим способом. Конструкция аппарата должна обеспечивать введение и фильтрацию испытуемого раствора в асептических условиях, извлечение мембраны для ее переноса в питательную среду или проведение инкубации после помещения питательной среды в аппарат.

Водные растворы. Небольшое количество подходящего стерильного растворителя, не подавляющего рост микроорганизмов, например, нейтрального раствора мясного или казеинового пептона концентрацией 1 г/л (pH 7,1 ± 0,2), помещают на мембрану аппарата и фильтруют. Растворитель может содержать подходящие нейтрализующие и/или инактивирующие вещества, например, в случае антибиотиков.

Содержимое контейнера или контейнеров, подлежащих испытанию, переносят на мембрану (мембраны), при необходимости, после разбавления до объема, используемого в испытании на пригодность, избранным стерильным растворителем; в любом случае, используют количества испытуемого продукта не менее указанных в Таблице *2.6.1.-2*. Немедленно фильтруют. Если испытуемый раствор обладает антимикробными свойствами, мембрану не менее трех раз промывают путем пропускания через нее каждый раз объема выбранного стерильного растворителя, указанного в испытании на пригодность. В процессе промывки объем не должен превышать 5×200 мл, даже если при проверке пригодности было показано, что такая промывка не полностью исключает антимикробную активность. Мембрану целиком переносят в питательную среду или в асептических условиях делят ее на две равные части, каждую из которых помещают в две подходящие среды. Используют такие же объемы питательных сред, как и в испытании на пригодность. Кроме того, среда может быть нанесена на мембрану в аппарате. Среды инкубируют в течение не менее 14 дней.

Таблица 2.6.1.-2

Минимальные количества тестируемого продукта, используемые для каждой питательной среды

Количество в контейнере	Минимальное количество, которое следует использовать для посева на каждую среду, если не обосновано и разрешено использование других количеств
Для жидкостей	
Менее 1 мл	Все содержимое каждого контейнера
1 – 40 мл	Половина содержимого каждого контейнера, но не менее 1 мл
Более 40 мл, но не более 100 мл	20 мл
Более 100 мл	10% содержимого контейнера, но не менее 20 мл
Для жидкостей, содержащих антибиотики	1 мл
Для других препаратов, растворимых в воде или в изопропилмиристате	Все содержимое каждого контейнера, составляющее не менее 200 мг
Нерастворимые препараты, кремы и мази, подлежащие суспендированию или эмульгации	Все содержимое каждого контейнера, составляющее не менее 200 мг
Для твердых веществ	
Менее 50 мг	Все содержимое каждого контейнера
50 мг и более, но менее 300 мг	Половина содержимого каждого контейнера, но не менее 50 мг
От 300 мг до 5 г	150 мг
Более 5 г	500 мг

Твердые растворимые препараты. Для каждой среды используют количество продукта, растворенного в подходящем растворителе, например, растворе натрия хлорида 0,9% или нейтральном растворе мясного или казеинового пептона концентрацией 1 г/л, не менее указанного в Таблице 2.6.1.-2, и продолжают испытание по методике, описанной выше для водных растворов, с использованием мембраны, соответствующей выбранному растворителю.

Масла и масляные растворы. Для каждой среды используют количество продукта не менее указанного в Таблице *2.6.1.-2*. Масла и масляные растворы, обладающие достаточно низкой вязкостью, могут быть подвергнуты фильтрованию через сухую мембрану без разбавления. Вязкие масла могут быть при необходимости разбавлены подходящим стерильным растворителем, для которого показано отсутствие антимикробной активности в условиях испытания, например, изопропилмиристатом. Дают маслу проникнуть в мембрану под действием собственной тяжести, затем фильтруют, постепенно увеличивая давление или вакуум. Мембрану промывают путем фильтрования не менее трех порций по 100 мл подходящего стерильного растворителя, например, нейтрального раствора мясного или казеинового пептона концентрацией 1 г/л, содержащего подходящий эмульгатор в концентрации, приемлемость которой была подтверждена в ходе испытания на пригодность, например, 10 г/л полисорбата 80. Мембрану или мембраны переносят в питательную среду или среды (или наоборот) в соответствии с указания-

ми, приведенными выше для водных растворов, и инкубируют при таких же температурах в течение тех же промежутков времени.

Мази и кремы. Для каждой среды используют количество продукта, не менее указанного в Таблице *2.6.1.-2*. Мази на жирной основе и водно-масляные эмульсии могут быть разбавлены до содержания 1% изопропилмиристатом, как описано выше, при необходимости, при нагревании до температуры, не превышающей 40^{0}С. В исключительных случаях может оказаться необходимым нагрев до температуры, не превышающей 44^{0}С. Фильтруют насколько возможно быстро и продолжают испытание в соответствии с указаниями, приведенными выше для масел и масляных растворов.

Прямая инокуляция питательной среды. Количество испытуемого препарата, предписанное в таблице 2.6.1.-2, помещают непосредственно в питательную среду. При этом объем продукта должен составлять не более 10% объема среды, если не предписано иное.

Если испытуемый продукт обладает антимикробной активностью, испытания выполняют после нейтрализации подходящим нейтрализующим агентом или путем разбавления в достаточном количестве питательной среды. При необходимости использования большого объема продукта предпочтительнее использовать концентрированную питательную среду, приготовленную с учетом последующего разбавления. Если это удобно, концентрированная среда может быть добавлена непосредственно к продукту в контейнере.

Масляные жидкости. Используют среды с добавкой подходящего эмульгатора в концентрации, приемлемость которой была подтверждена в ходе испытания на пригодность, например, 10 г/л полисорбата 80.

Мази и кремы. Готовят разбавлением в соотношении около 1:10 путем эмульгирования с использованием избранного эмульгатора в подходящем стерильном растворителе, например, растворе мясного или казеинового пептона концентрацией 1 г/л. Разбавленный продукт переносят в среду, не содержащую эмульгатора.

Инокулированную среду инкубируют в течение не менее 14 дней. Состояние культур оценивают несколько раз в течение инкубационного периода. Инокулированные среды, содержащие масляные продукты, ежедневно осторожно встряхивают. Однако, при использовании тиогликолевой или другой аналогичной среды для определения анаэробных микроорганизмов, встряхивание или перемешивание сводят к минимуму для поддержания анаэробных условий.

НАБЛЮДЕНИЕ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Время от времени в течение периода инкубации, а также по его завершении оценивают наличие макроскопических признаков микробного роста в средах. Если внесение испытуемого материала приводит к помутнению питательной среды, вследствие чего наличие или отсутствие микробного роста не может быть легко определено визуально, следует через 14 дней после начала инкубации перенести порции среды (каждая объемом не менее 1 мл) в другие сосуды, содержащие свежую аналогичную среду и инкубировать исходные сосуды и сосуды с перенесенными порциями в течение 4 дней.

Если признаков микробного роста не обнаруживается, то продукт признают выдерживающим испытание на стерильность. При наличии признаков микробного роста продукт не выдерживает испытание на стерильность, если не может быть

показано путем повторного испытания или другим способом, что результаты испытания не являются достоверными по причинам, не связанным с испытуемым продуктом. Результаты испытания могут быть признаны недостоверными лишь при выполнении не менее одного из нижеперечисленных условий:

а) данные микробиологического мониторинга зоны проверки стерильности указывают на произошедшие сбои,

б) проверка методики, используемой в данном испытании, привела к обнаружению недочетов,

в) в отрицательном контроле был обнаружен микробный рост,

г) после установления типа микроорганизмов, выделенных в ходе испытания, рост этого штамма (этих штаммов) может быть однозначно приписан ошибкам, вносимым материалами и/или методиками, используемыми при проведении испытания.

Если результаты испытания признаны недостоверными, испытание повторяют, используя то же количество образцов, что и в первоначальном тесте.

Если признаков микробного роста в ходе повторного испытания не обнаруживается, то продукт признают выдерживающим испытание на стерильность. Если в ходе повторного испытания обнаруживается рост, то продукт не выдерживает испытание на стерильность.

ПРИМЕНЕНИЕ ИСПЫТАНИЯ К ПАРЕНТЕРАЛЬНЫМ ПРЕПАРАТАМ, ОФТАЛЬМОЛОГИЧЕСКИМ И ДРУГИМ НЕИНЪЕКЦИОННЫМ ПРЕПАРАТАМ, ДЛЯ КОТОРЫХ ТРЕБУЕТСЯ ВЫПОЛНЕНИЕ ИСПЫТАНИЯ НА СТЕРИЛЬНОСТЬ

При использовании метода мембранной фильтрации используют, где это возможно, все содержимое контейнера, но не менее количеств, указанных в Таблице *2.6.1.-2*, при необходимости разбавляя приблизительно до 100 мл подходящим стерильным раствором, например, нейтральным раствором мясного или казеинового пептона концентрацией 1 г/л.

При использовании метода прямой инокуляции питательной среды используют количества, указанные в Таблице *2.6.1.-2*, если не оправдано и не разрешено применение других количеств. Испытания на стерильность в отношении бактерий и грибов выполняют на одном и том же образце испытуемого продукта. В случаях, когда объем или количество, содержащиеся в контейнере, являются недостаточными для проведения испытаний, для инокуляции различных сред используют содержимое двух или более контейнеров.

Таблица 2.6.1.-3

Минимальное количество испытуемых единиц

Количество единиц в партии	Минимальное количество тестируемых единиц для каждой среды, если не обосновано и разрешено иное*
Парентеральные препараты	
Не более 100 контейнеров	10%, но не менее 4 контейнеров

Более 100, но не более 500 контейнеров	10 контейнеров
Более 500 контейнеров	2%, но не более 20 контейнеров
Офтальмологические и другие неинъекционные препараты	
Не более 200 контейнеров	5%, но не менее 2 контейнеров
Более 200 контейнеров	10 контейнеров
В случаях, когда продукция представлена в форме контейнеров, содержащих одну дозу, применяют указанную выше схему для парентеральных препаратов	
Большие объемы твердых субстанций	
До 4 контейнеров	Каждый контейнер
Более 4, но не более 50 контейнеров	20%, но не менее 4 контейнеров
Более 50 контейнеров	2%, но не менее 10 контейнеров
Большие упаковки антибиотиков **(более 5 г)**	6 контейнеров
* Если содержимого одного контейнера достаточно для инокуляции двух сред, то в данной колонке дано количество контейнеров, необходимое для обеих сред.	

УКАЗАНИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ ИСПЫТАНИЯ НА СТЕРИЛЬНОСТЬ

Цель испытания на стерильность, как и всех фармакопейных испытаний, заключается в предоставлении независимым аналитикам средств проверки соответствия данного материала требованиям Фармакопеи. Производителю не вменяется в обязанность проводить такие испытания и не запрещается использовать модификации установленного метода или альтернативные методы при условии, что данная продукция будет соответствовать требованиям Фармакопеи при проведении испытания с использованием официального метода.

Условия проведения испытаний. Асептические условия проведения испытания могут быть достигнуты, например, использованием камеры с ламинарным потоком воздуха класса А, расположенной в чистом помещении класса В, или с помощью изолятора.

Руководство для производителей. Уровень достоверности, подтверждаемый удовлетворительным результатом испытания на стерильность (отсутствие загрязняющих единиц в образце), в отношении к качеству партии зависит от ее однородности, условий производства и эффективности принятого плана отбора проб. Для целей данного описания партия определяется как однородный набор запечатанных контейнеров, приготовленных таким образом, чтобы риск микробного загрязнения был одинаковым для каждой единицы.

Для продукции, стерилизуемой на последней стадии производства, биологически обоснованные и автоматически документированные фактические доказательства правильного протекания процесса стерилизации для всей партии дают большую гарантию, по сравнению с испытанием на стерильность. Обстоятельст-

ва, при которых допустим параметрический выпуск серии, описаны в разделе «Методы приготовления стерильной продукции» (*5.1.1*). Для подтверждения асептических условий производства может применяться метод наполнения питательными средами. За исключением этих ситуаций, испытание на стерильность является единственным аналитическим методом для продукции, производство которой осуществляется в асептических условиях.

Вероятность определения наличия микроорганизмов в ходе испытания на стерильность возрастает с увеличением их количества в испытуемом образце и варьируется в зависимости от способности к росту имеющихся микроорганизмов. Вероятность обнаружения очень низких уровней микробного загрязнения, даже если оно в пределах партии является однородным, весьма мала. Интерпретация результатов испытания на стерильность основывается на предположении, что содержимое любого контейнера в партии, если он будет подвергнут испытанию, даст одинаковый результат. Поскольку очевидно, что каждый контейнер не может быть подвергнут испытанию, следует использовать соответствующий план отбора проб. В случае асептического производства рекомендуется отбирать образцы в начале и в конце выпущенной партии, а также после существенного вмешательства в технологический процесс.

Руководство, касающееся минимального рекомендуемого количества образцов, отбираемых для проведения испытания, в зависимости от размера партии, приведено в таблице *2.1.6.-3*. При использовании этих рекомендаций следует учитывать объем препарата в контейнере, валидацию метода стерилизации и любые другие особые условия, касающиеся планируемой стерильности продукции.

Наблюдение и интерпретация результатов. Общепринятые микробиологические и биохимические методы в общем случае являются удовлетворительными для идентификации микроорганизмов, выделяемых в ходе испытания на стерильность. Однако, если производитель желает использовать лишь критерий (d) для признания результатов испытания на стерильность недостоверными, может оказаться необходимым использование чувствительных методов классификации для демонстрации идентичности микроорганизма, выделенного при испытании продукции, – микроорганизму, выделенному из материалов и окружающей обстановки. Хотя с помощью рутинных микробиологических и биохимических методов может быть показано, что два изолированных штамма не являются идентичными, эти методы могут быть недостаточно чувствительными и надежными для получения однозначного доказательства того, что два штамма имеют один и тот же источник. Для определения того, что микроорганизмы имеют общее происхождение и клонально связаны, может оказаться необходимым использование более чувствительных тестов, например, молекулярной классификации по гомологии РНК/ДНК.

2.6.2. МИКОБАКТЕРИИ

Если испытуемый образец может содержать микроорганизмы, отличные от микобактерий, его обрабатывают подходящим деконтаминирующим раствором, например, раствором ацетилцистеина и гидроксида натрия или раствором натрия лаурилсульфата.

На каждую из двух подходящих твердых питательных сред (например, среда Лёвенштейна-Йенсена или среда Миддлбрук 7H10) наносят по 0,2 мл образца.

Эксперимент выполняют в трех повторностях. В подходящую жидкую питательную среду также в трех повторностях вносят по 0,5 мл образца. Все среды инкубируют при 37°С в течение 56 дней.

Устанавливают способность среды к обеспечению роста в присутствии испытуемого продукта путем инокуляции подходящего штамма семейства *Mycobacterium*, например, BCG, и, при необходимости, используют подходящий нейтрализующий агент.

Если в течение первых восьми дней инкубации наблюдается развитие посторонних микроорганизмов, испытание повторяют с одновременным проведением испытания на бактериологическую стерильность.

Продукт выдерживает испытание, если в конце инкубационного периода ни в одной из пробирок не наблюдается роста микобактерий.

2.6.3. ИСПЫТАНИЯ НА ПОСТОРОННИЕ ВИРУСЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КУРИНЫХ ЭМБРИОНОВ

Используют жидкую вакцину или восстанавливают подлежащее испытанию количество вакцины, высушенной из замороженного состояния, применяя указанную на этикетке или другую подходящую жидкость, содержащую в каждом случае соответствующие антибиотики. Если это предписано в частной статье, нейтрализуют моноспецифической антисывороткой. При необходимости разбавляют таким образом, чтобы 0,2 мл смеси содержали 10 доз вакцины. Смесь прививают двум группам по 10 куриных эмбрионов возрастом от 9 до 11 дней, полученных из групп, не содержащих указанных патогенов:

- 0,2 мл в аллантоисную полость каждого из яиц первой группы,

- 0,2 мл на хориоаллантоисную мембрану каждого из яиц второй группы.

В течение 7 дней ежедневно состояние яиц оценивают визуально путем просвечивания. Эмбрионы, погибающие в течение первых 24 часов, не учитывают, считая, что их гибель вызвана неспецифическими причинами: результаты испытания считают достоверными при условии, что не менее 6 эмбрионов из каждой группы выживают в течение более 24 часов после прививки. Все эмбрионы, погибшие более чем через 24 часа после прививки, а также выжившие в течение 7 дней, проверяют на наличие аномалий. Проверяют также хориоаллантоисные мембраны на наличие аномалий, аллантоисные жидкости – на наличие гемагглютинирующих агентов, а клетки, отделяемые путем центрифугирования от аллантоисных жидкостей, – на наличие вируса инфекционного бронхита с использованием метода флуоресцирующих антител. Выполняют дополнительный эксперимент с эмбрионами. По отдельности отбирают образцы материала из живых и погибших эмбрионов и прививают каждый из образцов 10 эмбрионам каждым из вышеописанных методов. При этом материал хориоаллантоисных мембран должен наноситься на хориоаллантоисные мембраны, а аллантоисная жидкость должна вводиться в аллантоисную полость. Яйца наблюдают в течение 7 дней и оценивают их состояние в соответствии с вышеприведенными указаниями. В случае, если вакцина приводит к гибели или ненормальному развитию, она не выдерживает испытание.

2.6.4. ИСПЫТАНИЕ НА ВИРУСЫ ЛЕЙКОЗА

Если это предписано в частной статье, вакцину нейтрализуют моноспецифической антисывороткой. Вакцину в количестве 10 доз прививают культуре фибробластов куриных эмбрионов, поддерживающей рост подгрупп А и В вируса лейкоза. Культуры должны состоять не менее, чем из пяти повторов, площадь каждого из которых составляет не менее 60 $см^2$. Субкультивирование фибробластов производят с интервалами от 3 до 4 дней; весь период поддерживания составляет не менее 9 дней. В конце последнего периода клетки собирают, ресуспендируют, получая концентрацию 10^7 клеток в миллилитре, и готовят экстракт. Для каждого из экстрактов проводят испытание на связывание комплемента для групп-специфического антигена птичьего лейкоза. Параллельно проводят испытание для контрольных групп с привитым вирусом лейкоза подгрупп А и В. Если обнаруживаются любые свидетельства наличия вируса лейкоза, вакцина не выдерживает испытание. Если результаты не позволяют сделать определенный вывод, проводят дальнейшее субкультивирование фибробластов и продолжают испытание до получения однозначного результата.

2.6.5. ИСПЫТАНИЕ НА ПОСТОРОННИЕ ВИРУСЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР

Используют жидкую вакцину или восстанавливают подлежащее испытанию количество вакцины, высушенной из замороженного состояния, применяя указанную на этикетке или другую подходящую жидкость. Если это предписано в частной статье, вакцину нейтрализуют моноспецифической антисывороткой. При необходимости разбавляют таким образом, чтобы 0,1 мл смеси содержали 10 доз вакцины. 0,5 мл смеси прививают культурам, полученным из куриных почек или печени куриных эмбрионов. Культуры выделяют из групп, не содержащих указанных патогенов. Выдерживают для адсорбции в течение 1 часа при 37^0С. Культуры должны состоять не менее, чем из пяти повторов, и иметь общую площадь не менее 150 $см^2$. Культуры наблюдают в течение не менее 5 дней, отмечая наличие любых специфических цитопатических эффектов, вызываемых вакциной. Если специфических эффектов не наблюдается, выполняют дополнительные испытания с клетками и жидкостями, отобранными из всех культур с интервалами не менее 5 дней, и проводят наблюдение в течение инкубационного периода, составляющего 20 дней. Конечные культуры испытывают также на наличие гемадсорбирующих агентов с использованием куриных эритроцитов. Гемадсорбирующие агенты представляют собой микроорганизмы или вирусы, вызывающие адсорбцию эритроцитов на поверхности клеточных культур, на которых происходит их репликация. Гемадсорбцию можно наблюдать следующим образом: в конце периода испытания к отделенным и промытым монослоям клеточной культуры добавляют 0,5% суспензии промытых эритроцитов. По окончании периода адсорбции (20 минут при 4^0С) монослой осторожно промывают раствором хлорида натрия в *фосфатном буфере рН 7,4 R* и изучают под микроскопом. При наличии гемадсорбции на монослоях клеток наблюдаются скопления эритроцитов. Результаты испытания достоверны, если не менее 80% культур выживают после каждого посева. Вакцина не выдерживает испытание, если наблюдаются любые цитопатические эффекты или обнаруживается наличие гемадсорбирующих агентов.

2.6.6. ИСПЫТАНИЕ НА ПОСТОРОННИЕ АГЕНТЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЦЫПЛЯТ.

Если в частной статье нет иных указаний, испытание проводят не менее, чем на 10 цыплятах двухнедельного возраста, отобранных из групп, не содержащих специфических патогенов. Каждому из цыплят делают прививку в количестве 100 доз внутримышечно и 10 доз путем закапывания в глаза. Через две недели прививки повторяют. Птиц наблюдают в течение пяти недель со дня первой прививки. В течение периода наблюдения птицам не вводятся антимикробные агенты.

Проводят отбор сыворотки у каждого из цыплят перед первой прививкой и в конце испытания. Каждую из сывороток исследуют соответствующим методом. Определяют наличие антител против нижеперечисленных инфекционных агентов, за исключением антител против вируса, из которого была изготовлена вакцина. Вакцина не выдерживает испытания при наличии любых доказательств присутствия посторонних агентов. Результаты испытания недостоверны при обнаружении любых антител до прививки. В таком случае испытание повторяют. Результаты испытания также недостоверны, если к его концу выживает менее 80% животных. По согласованию с компетентными органами могут применяться и другие методы испытания при условии их соответствующей специфичности и чувствительности, не меньшей по сравнению с чувствительностью нижеуказанных методов.

Инфекция	**Тип испытания**
Инфекционный бронхит[(1)]	Агаровый гель – преципитин или ингибирование гемагглютинации
Инфекционный бурсит (болезнь Гумборо)	Агаровый гель – преципитин
Болезнь Марека	Агаровый гель – преципитин
Болезнь Ньюкасла	Ингибирование гемагглютинации
Инфекции, вызываемые *Salmonella pullorum*	Агглютинация
Аденовирусные инфекции[(2)]	Агаровый гель – преципитин
Инфекции, вызываемые вирусом птичьей энцефалопатии	Агаровый гель – преципитин или твердофазное иммуноферментное определение (ELISA)
Реовирусные инфекции[(2)]	Агаровый гель – преципитин
Инфекции, вызываемые вирусом лейкоза[(2)]	Нейтрализация сыворотки
Грипп А[(2)]	Агаровый гель – преципитин
Инфекционный ларинготрахеит[(2)]	Нейтрализация сыворотки

[(1)]По согласованию с компетентными органами, при рутинных испытаниях партий продукции данное испытание может не выполняться, если для каждой партии выполнено испытание на посторонние вирусы с использованием оплодотворенных яиц (*2.6.3*).
[(2)]По согласованию с компетентными органами, при рутинных испытаниях партий продукции данное испытание может не выполняться, за исключением случаев, когда это требуется в соответствии с указаниями в частной статье.

2.6.7. МИКОПЛАЗМЫ

Если испытание на микоплазмы предписано для основного или рабочего клеточного банка, для посевной партии вирусов или для контрольных клеток, применяют как метод культивирования, так и метод индикаторной клеточной культуры. Если испытание предписано для вирусного сбора, большого количества вакцины или готовой партии продукции, применяют метод культивирования. Метод индикаторной клеточной культуры может при необходимости также использоваться для контроля сред.

МЕТОД КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

ВЫБОР ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ

Испытание выполняют с использованием достаточного количества как твердых, так и жидких питательных сред для того, чтобы в избранных условиях инкубации был обеспечен рост небольшого количества микоплазм, которые могут присутствовать в испытуемом продукте. Жидкие среды должны содержать феноловый красный. Для ряда сред показано наличие удовлетворительных питательных свойств, по крайней мере, для нижеперечисленных организмов. Для каждой новой партии среды должны быть подтверждены питательные свойства в отношении соответствующих организмов из списка.

Acholeplasma laidlawii (вакцины для медицинского и ветеринарного применения, в процессе производства которых используются антибиотики)

Mycoplasma gallisepticum (в случаях, когда для производства вакцин используются материалы, имеющие птичье происхождение или для вакцин, предназначенных для применения в птицеводстве)

Mycoplasma hyorhinis (ветеринарные вакцины, кроме птичьих)

Mycoplasma orale (вакцины для медицинского и ветеринарного применения)

Mycoplasma pneumoniae (вакцины для медицинского применения) или другие подходящие виды, связанные с ферментацией D-глюкозы

Mycoplasma synoviae (в случаях, когда для производства вакцин используются материалы, имеющие птичье происхождение или для вакцин, предназначенных для применения в птицеводстве).

Тест-штаммы представляют собой изоляты, подвергнутые не более, чем 15 пересевам, и хранящиеся в замороженном или лиофилизированном состоянии. После клонирования принадлежность штамма к требуемому виду определяется подходящим методом путем сравнения с типовыми культурами, например:

A. laidlawii	NCTC 10116	CIP 75.27	ATCC 23206
M. gallisepticum	NCTC 10115	CIP 104967	ATCC 19610
M. hyorhinis	NCTC 10130	CIP 104968	ATCC 17981
M. orale	NCTC 10112	CIP 104969	ATCC 23714
M. pneumoniae	NCTC 10119	CIP 103766	ATCC 15531
M. synoviae	NCTC 10124	CIP 104970	ATCC 25204

УСЛОВИЯ ИНКУБАЦИИ

Инокулированную среду делят на две равные части, одну из которых инкубируют в аэробных условиях, а другую – в микроаэрофильных условиях; в случае твердых сред поддерживают атмосферную влажность, достаточную для предотвращения высыхания поверхности. В случае аэробных условий при инкубации твердых сред в атмосфере должно присутствовать от 5 до 10% диоксида углерода. Инкубацию в микроаэрофильных условиях проводят в атмосфере азота, в которой, в случае твердых сред, содержится от 5 до 10% диоксида углерода.

ПИТАТЕЛЬНЫЕ СВОЙСТВА

Питательные свойства испытывают для каждой новой партии среды. Выбранные среды засевают соответствующими тест-организмами. На чашку диаметром 60 мм, содержащую 9 мл твердой среды, наносят не менее 100 колониеобразующих единиц, а в контейнер вместимостью 100 мл, содержащий соответствующую жидкую среду, вносят не менее 40 колониеобразующих единиц; для каждого вида организмов используют отдельные чашки и контейнеры. Среды инкубируют в условиях, в которых проводится основное испытание (аэробных, микроаэрофильных или тех и других, в зависимости от потребностей тест-организма). Среда выдерживает испытание на питательные свойства, если наблюдается адекватный рост тест-организмов, сопровождаемый соответствующим изменением окраски жидкой среды.

ИНГИБИРУЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА

Проводят испытание на питательные свойства в присутствии испытуемого продукта. Если рост тест-организмов заметно менее выражен, чем в отсутствии испытуемого продукта, то последний содержит ингибирующие вещества, требующие нейтрализации (или исключения их влияния другим способом, например, разбавлением) перед проведением испытания на микоплазмы. Эффективность нейтрализации или иного процесса проверяется путем повторения испытания на ингибирующие вещества после нейтрализации.

ИСПЫТАНИЕ АНАЛИЗИРУЕМОГО ПРОДУКТА НА МИКОПЛАЗМЫ

В случае твердых сред используют чашки диаметром 60 мм, содержащие 9 мл питательной среды. Каждая из используемых сред должна содержаться не менее, чем в двух чашках. На каждую чашку наносят по 0,2 мл испытуемого продукта; в каждую жидкую среду вносят испытуемый продукт в соотношении 10 мл на 100 мл среды. Инкубируют при температуре от 35 до 38^{0}С в аэробных и микроаэрофильных условиях в течение 21 дня. Одновременно инкубируют порции по 100 мл каждой среды без испытуемого продукта для контроля. Если при добавлении испытуемого продукта происходит существенное изменение показателя рН, исходное значение восстанавливают добавлением раствора хлористоводородной кислоты или гидроксида натрия. В первый, второй и третий дни после инокуляции выполняют пересев по 0,2 мл каждой из жидких культур на чашки с твердыми средами (по две чашки для каждой из сред) и инкубируют при температуре от 35 до 38^{0}С в аэробных и микроаэрофильных условиях в течение не менее 21 дня. Процедуру повторяют на шестой, седьмой и восьмой, а также на тринадцатый и четырнадцатый дни испытания. Состояние жидких сред контролируют каждые два

или три дня и, в случае изменения окраски, выполняют пересев немедленно. Состояние твердых сред оценивают один раз в неделю.

Если в жидких средах обнаруживается бактериальное или грибковое загрязнение, испытание повторяют. Если не ранее, чем через семь дней после инокуляции, не более, чем одна чашка с каждой стадии испытания имеет случайные бактериальные или грибковые примеси или разбита, результаты, связанные с этой чашкой могут не учитываться, если при немедленной проверке на ней не обнаруживается признаков роста микоплазм. Если на любой стадии испытания более одной чашки подвергаются случайному загрязнению бактериями или грибами, или разбивается, испытание считают недействительным и повторяют.

Испытание проводят также для положительных контролей, приготовленных путем инокуляции не более 100 колониеобразующих единиц подходящего штамма, например, *M. orale* или *M. pneumoniae.*

В конце периодов инкубации все инокулированные твердые среды изучают под микроскопом для установления наличия микоплазм. Продукт выдерживает испытание, если ни на одной инокулированной среде не обнаружено роста микоплазм. При обнаружении роста микоплазм испытание может быть проведено повторно с использованием удвоенного количества инокулята, сред и чашек; если роста микоплазм не обнаруживается, то продукт выдерживает испытание. Результаты испытания недостоверны, если в положительных контролях не наблюдается роста соответствующих тест-организмов.

МЕТОД ИНДИКАТОРНОЙ КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЫ

Клеточные культуры окрашиваются флуоресцентным красителем, обладающим способностью связываться с ДНК. Микоплазмы детектируются по их характерной точечной или волокнистой флуоресценции на клеточной поверхности и, при высоком уровне загрязнения, в прилегающем пространстве.

ПРОВЕРКА СУБСТРАТА

Метод подвергают предварительному испытанию с использованием субстрата клеточной культуры Веро и инокулята, содержащего не более 100 колониеобразующих единиц хорошо растущего на жидкой или твердой среде штамма, и показывают возможность определения этим методом потенциальных примесей микоплазм, например, подходящих штаммов *Mycoplasma hyorhinis* и *Mycoplasma orale*. Могут использоваться и другие клеточные субстраты, например, производственная линия клеток, если было показано, что чувствительность определения микоплазм не будет меньшей.

Метод испытания

Отбирают не менее 1 мл испытуемого продукта и используют его для засева в двух повторностях индикаторной клеточной культуры, представляющей в совокупности не менее 25 см^2 площади клеточной культуры. Руководствуются указаниями подраздела «Процедура».

В испытание включают отрицательный (неинфицированный) контроль и два положительных контроля, содержащих микоплазмы, например, *M. hyorhinis* и *M.*

orale. В положительных контролях используют инокулят, содержащий не более 100 колониеобразующих единиц.

Если для вирусных суспензий на интерпретацию результатов влияют заметные цитопатические эффекты, вирус может быть нейтрализован с использованием специфической антисыворотки, не обладающей ингибирующим эффектом в отношении микоплазм или может использоваться субстрат клеточной культуры, не поддерживающий рост вируса. Для демонстрации отсутствия ингибирующего эффекта сыворотки выполняют положительные контрольные тесты в ее присутствии и отсутствии.

Процедура

1. Среду однородно засевают культурой (от 2×10^4 до 2×10^5 клеток в миллилитре, от 4×10^3 до $2{,}5 \times 10^4$ клеток на см^2) и инкубируют при температуре 36 ± 1^0С не менее 2 дней. Вносят испытуемый продукт и инкубируют не менее 2 дней; выполняют не менее одного пересева. Последнюю субкультуру выращивают на покровных стеклах в подходящих контейнерах или на другой подходящей поверхности. Не допускают достижения слияния в последней субкультуре, так как это может привести к ингибированию окрашивания и ухудшить визуализацию микоплазм.

2. Среду извлекают и выбрасывают.

3. Монослой промывают *раствором хлорида натрия в фосфатном буфере pH 7,4 R*, затем смесью равных объемов этого раствора и подходящего фиксирующего раствора и, наконец, чистым фиксирующим раствором; если для окрашивания используется *бисбензимид R*, то подходящим фиксирующим раствором является свежеприготовленная смесь 1 объема *ледяной уксусной кислоты R* и 3 объемов *метанола R*.

4. Добавляют фиксирующий раствор и оставляют на 10 минут.

5. Фиксирующий раствор удаляют и выбрасывают.

6. Если монослой будет подвергаться окрашиванию позже, его полностью высушивают. (Требуется особое внимание при окрашивании высушенных стекол ввиду возможности возникновения артефактов).

7.Если монослой подлежит окрашиванию немедленно, фиксирующий раствор смывают дважды стерильной водой; промывные воды отбрасывают.

8. Добавляют *рабочий раствор бисбензимида R* или другой подходящий агент, обладающий способностью вызывать появление окраски при взаимодействии с ДНК, и выдерживают в течение 10 минут.

9. Краситель удаляют и промывают монослой водой.

10. При необходимости каждое покровное стекло готовят к изучению путем нанесения капли смеси равных объемов *глицерина* и *раствора хлорида натрия в фосфатном буфере pH 7,4 R*; удаляют с краев стекла излишки смеси.

11. Стекла изучают методом эпифлуоресценции (фильтр возбуждения 330 нм / 380 нм, барьерный фильтр LP 440 нм) при 100–400-кратном (или большем) увеличении.

12. Изучая внеядерную флуоресценцию, сравнивают микроскопическую картину тест-культур с микроскопическими картинами отрицательного и положительных контролей. Микоплазмы проявляют себя в виде точек или волокон, расположенных над цитоплазмой и иногда в межклеточном пространстве.

Испытуемый продукт выдерживает испытание, если в тест-культурах, на которые он был нанесен, нет признаков присутствия микоплазм. Результаты испытания недостоверны, если в положительных контролях не обнаруживается присутствия соответствующих тест-организмов.

Следующий раздел публикуется для информации.

СРЕДЫ, РЕКОМЕНДУЕМЫЕ ДЛЯ МЕТОДА КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Рекомендуются нижеследующие среды. Могут использоваться и другие среды при условии, что на каждой партии в присутствии и отсутствии испытуемого продукта продемонстрирована способность к поддерживанию роста микоплазм.

СРЕДЫ, РЕКОМЕНДУЕМЫЕ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ MYCOPLASMA GALLISEPTICUM

Жидкая среда

Бульон из экстракта говяжьего сердца (1)	90,0 мл
Лошадиная сыворотка (не подвергнутая нагреву)	20,0 мл
Дрожжевой экстракт (250 г/л)	10,0 мл
Ацетат таллия (раствор концентрацией 10 г/л)	1,0 мл
Феноловый красный (раствор концентрацией 0,6 г/л)	5,0 мл
Пенициллин (20 000 МЕ/мл)	0,25 мл
Дезоксирибонуклеиновая кислота (раствор концентрацией 0,6 г/л)	1,2 мл

Значение pH доводят до 7,8.

Твердая среда

Готовят так же, заменяя бульон из экстракта говяжьего сердца на агар из экстракта говяжьего сердца, содержащий агар в концентрации 15 г/л.

СРЕДЫ, РЕКОМЕНДУЕМЫЕ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ MYCOPLASMA SYNOVIAE

Жидкая среда

Бульон из экстракта говяжьего сердца (1)	90,0 мл
Важнейшие витамины (2)	0,025 мл
Глюкозы моногидрат (раствор концентрацией 500 г/л)	2,0 мл
Поросячья сыворотка (инактивированная при 56^0С 30 минут)	12,0 мл
β-Никотинамидадениндинуклеотид (раствор концентрацией 10 г/л)	1,0 мл
Цистеина гидрохлорид (раствор концентрацией 10 г/л)	1,0 мл
Феноловый красный (раствор концентрацией 0,6 г/л)	5,0 мл
Пенициллин (20 000 МЕ/мл)	0,25 мл

Смешивают растворы β-никотинамидадениндинуклеотида и цистеина гидрохлорида и через 10 минут добавляют к остальным компонентам. Значение pH доводят до 7,8.

Твердая среда

Бульон из экстракта говяжьего сердца (1)	90,0 мл
Ионагар (3)	1,4 г

Значение pH доводят до 7,8, стерилизуют автоклавированием, после чего добавляют:

Важнейшие витамины (2)	0,025 мл
Глюкозы моногидрат (раствор концентрацией 500 г/л)	2,0 мл
Поросячья сыворотка (не подвергнутая нагреву)	12,0 мл
β-Никотинамидадениндинуклеотид (раствор концентрацией 10 г/л)	1,0 мл
Цистеина гидрохлорид (раствор концентрацией 10 г/л)	1,0 мл
Феноловый красный (раствор концентрацией 0,6 г/л)	5,0 мл
Пенициллин (20 000 МЕ/мл)	0,25 мл

СРЕДЫ, РЕКОМЕНДУЕМЫЕ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МИКОПЛАЗМ, ИМЕЮЩИХ ОТЛИЧНОЕ ОТ ПТИЧЬЕГО ПРОИСХОЖДЕНИЕ

Жидкая среда

Сбалансированный солевой раствор Хэнкса (модифицированный) (4)	800 мл
Дистиллированная вода	67 мл
Экстракт из сердца и мозгов (5)	135 мл
Бульон PPLO (6)	248 мл
Дрожжевой экстракт (170 г/л)	60 мл
Бацитрацин	250 мг
Метициллин	250 мг
Феноловый красный (5 г/л)	4,5 мл
Ацетат таллия (раствор концентрацией 56 г/л)	3 мл
Лошадиная сыворотка	165 мл
Поросячья сыворотка	165 мл

Значение pH доводят до 7,4 – 7,45.

Твердая среда

Сбалансированный солевой раствор Хэнкса (модифицированный) (4)	200 мл
DEAE-декстран	200 мг
Ионагар (3)	15,65 мг

Хорошо перемешивают и стерилизуют автоклавированием. Охлаждают до 100^{0}С. Добавляют к 1740 мл вышеописанной жидкой среды.

(1) *Бульон из настоя говяжьего сердца*

Говяжье сердце (для приготовления экстракта)	500 г
Пептон	10 г
Натрия хлорид	5 г
Дистиллированная вода	до 1000 мл

Стерилизуют автоклавированием.

(2) *Важнейшие витамины*

Биотин	100 мг
Кальция пантотенат	100 мг
Холина хлорид	100 мг
Фолиевая кислота	100 мг
i-Инозит	200 мг
Никотинамид	100 мг
Пиридоксаля гидрохлорид	100 мг
Рибофлавин	10 мг
Тиамина гидрохлорид	100 мг
Дистиллированная вода	до 1000 мл

(3) *Ионагар*

Высокочистый агар для использования в микробиологии и иммунологии готовят ионообменным методом с получением продукта исключительной чистоты, прозрачности и прочности образующегося геля. Приблизительное содержание в ионагаре:

Вода	12,2%
Зола	1,5%
Зола, нерастворимая в кислоте	0,2%
Хлор	0
Фосфаты (в пересчете на P_2O_5)	0,3%
Общий азот	0,3%
Медь	0,0008%
Железо	0,017%
Кальций	0,28%
Магний	0,32%

(4) *Сбалансированный солевой раствор Хэнкса (модифицированный)*

Натрия хлорид	6,4 г
Калия хлорид	0,32 г
Магния сульфат гептагидрат	0,08 г
Магния хлорид гексагидрат	0,08 г
Кальция хлорид безводный	0,112 г
Натрия гидрофосфат дигидрат	0,0596 г
Калия дигидрофосфат безводный	0,048 г
Дистиллированная вода	до 1000 мл

(5) *Экстракт из сердца и мозгов*

Экстракт мозга теленка	200 г
Экстракт говяжьего сердца	250 г
Протеозный пептон	10 г
Глюкозы моногидрат	2 г
Натрия хлорид	5 г
Натрия гидрофосфат безводный	2,5 г
Дистиллированная вода	до 1000 мл

(6) *Бульон PPLO*

Экстракт говяжьего сердца	50 г
Пептон	10 г
Натрия хлорид	5 г
Дистиллированная вода	до 1000 мл

2.6.8 ПИРОГЕННОСТЬ

Испытание состоит в измерении роста температуры тела вызванного у кроликов внутривенным введением стерильного раствора испытуемой субстанции.

Выбор животных. Используют здоровых взрослых кроликов обоего пола массой не менее 1,5 кг, # желательно от 2,0 до 3,5 кг # получавших полноценное сбалансированное питание, не включающее антибиотиков, масса тела которых не снижалась в течение недели, предшествующей испытанию. Кролика не следует использовать в испытании на пирогенность, если:

а) он использовался в испытании на пирогенность, давшем отрицательный результат, в течение предшествующих 3 дней:

б) он использовался в испытании на пирогенность, в котором испытуемая субстанция была признана не соответствующей требованиям, в течение предшествующих 3 недель.

Кролики, бывшие в опыте, могут быть использованы для определения пирогенности повторно, но не ранее чем через 3 суток, если внедренный им до этого раствор лекарственного средства или вода для инъекций были непирогенными. Если же введенный раствор лекарственного средства или вода для инъекций оказались пирогенными, кролики могут быть использованы для дальнейших опытов через 2 недели. При повышении температуры у кроликов в подобных случаях на 1,2°С и более они используются через 3 недели. Если исследуемые вещества обладают антигенными свойствами, то одних и тех же кроликов нельзя использовать для испытания повторно (если нет специальных указаний в частной статье)

Помещение для животных. Кроликов содержат индивидуально в спокойном помещении при однородной подходящей температуре. Кроликов не кормят в течение ночи и до окончания испытания. В течение испытания кроликам не дают воду. Испытание проводят в тихом помещении, где отсутствует риск возникновения помех, которые могут возбудить животных, и в котором температура поддерживается на уровне, не более, чем на 3°С отличающемся от температуры, поддерживаемой в месте постоянного содержания кроликов, или в котором кролики содержались в течение не менее 18 часов до начала испытания.

Материалы. Стеклянная посуда, шприцы и иглы. Тщательно моют всю стеклянную посуду, шприцы и иглы водой для инъекций и нагревают в сухожаровом шкафу при 250°С в течение 30 минут или при 200°С в течение 1 часа.

Клетки. Клетки для кроликов, температура которых измеряется с помощью электрического прибора, устроены таким образом, чтобы животные фиксировались лишь с помощью свободно закрепленных на шее хомутов; остальная часть тела остается относительно свободной так, чтобы кролики могли сидеть в обычном положении. Они не удерживаются с помощью ремней или другими подобны-

ми методами, которые могут причинить вред животному. Животные помещаются в клетки не менее чем за 1 час до первого измерения температуры и остаются там в течение испытания.

Термометры. Используют термометр или электрическое устройство, показывающее температуру с точностью до 0,1^{0}С, вводя его в прямую кишку кролика на глубину около 5-7 см. Глубина введения постоянна для каждого из кроликов в течение каждого из испытаний. При использовании электрического устройства, оно может оставаться на месте в течение всего испытания.

Предварительное испытание. После отбора животных, за 1–3 дня до проведения испытания продукции, тем из них, которые не использовались в течение последних двух недель, вводят внутривенно апирогенный раствор хлорида натрия концентрацией 9 г/л, нагретый приблизительно до 37,0^{0}С в количестве 10 мл на килограмм массы тела. Записывают температуру животных, начиная не менее, чем за 90 минут до введения и продолжая в течение 3 часов после введения раствора. Животные, температура которых колеблется в пределах более 0,6^{0}С, не используются в основном испытании.

Основное испытание. Испытание проводят с использованием группы из трех кроликов.

Подготовка и введение продукта. Испытуемую жидкость перед введением нагревают до 37,0^{0}С. Испытуемый продукт может быть растворен или разведен в апирогенном растворе, содержащем 9 г/л хлорида натрия, или другой растворителем, указанной в частной статье. Раствор медленно вводят в крайнюю вену уха каждого из кроликов в течение не более 2 минут, если иное не предписано в частной статье. Количество вводимого продукта варьируется в зависимости от испытуемого препарата и указывается в частной статье. Вводимый объем должен составлять не менее 0,5 мл и не более 10 мл на 1 кг массы тела.

Объем введенного раствора должен составлять не менее 0,1 мл и не более 10 мл на 1,0 кг массы тела кролика.

Определение исходной и максимальной температуры. За «исходную температуру» каждого из кроликов принимают среднее из двух значение температуры, записанных для данного кролика с интервалом 30 минут в течение 40 минут, предшествующих введению испытуемого продукта. «Максимальная температура» каждого из кроликов – самая высокая температура, записанная для данного кролика в течение 3 часов после введения. Температуру каждого из кроликов записывают с интервалами, не превышающими 30-60 минут, начиная не менее, чем за 90 минут до введения испытуемого продукта и продолжая в течение 3 часов после введения. За результат испытания принимают разность между максимальной и исходной температурами каждого из кроликов. При отрицательной разности результат принимают равным нулю.

При определении исходной температуры кролики, у которых два последовательных значения температура варьируется в пределах, превышающих 0,2^{0}С, изымаются из испытания. В каждом из испытаний используют кроликов, исходная температура которых отличается друг от друга не более, чем на 1^{0}С. Кролики, исходная температура которых выше 39,5^{0}С или ниже 38,5^{0}С, изымаются из испытания.

Интерпретация результатов. После проведения испытания на группе из трех кроликов, его при необходимости повторяют на других группах из трех кроликов (суммарно до четырех групп), в зависимости от полученных результатов. Если суммированный результат, полученный в первой группе, не превышает значение,

данное во второй колонке таблицы 2.6.8.-1, считают, что субстанция выдерживает испытание. Если суммированный результат превышает значение, данное во второй колонке таблицы, но не превышает значение, данное в третьей колонке таблицы, испытание повторяют, как указано выше. Если суммированный результат превышает значение, данное в третьей колонке таблицы, считают, что продукт не выдерживает испытание.

Таблица 2.6.8.-1.

Количество кроликов	**Продукт выдерживает испытание при суммированном результате, не превышающем:**	**Продукт не выдерживает испытание при суммированном результате, превышающем:**
3	1,15^{0}C	2,65^{0}C
6	2,80^{0}C	4,30^{0}C
9	4,45^{0}C	5,95^{0}C
12	6,60^{0}C	6,60^{0}C

Интерпретация результатов

Воду для инъекций или раствор лекарственного средства считают непирогенным, если сумма повышений температуры у 3 кроликов меньше или равна 1,4^{o}C; если эта сумма превышает 2,2^{o}C, то воду для инъекций или раствор лекарственного средства считают пирогенными. В случаях, когда сумма повышений температуры у 3 кроликов находится в пределах от 1,5 до 2,2^{o}C, испытание повторяют дополнительно на 5 кроликах. В этом случае воду и для инъекций или раствор лекарственного средства считают непирогенным, если сумма повышений температуры у всех 8 кроликов не превышает 3,7^{o}C. Если же эта сумма равна 3,8^{o}C или больше, воду для инъекций или раствор лекарственного средства считают пирогенным.

Таблица 2.6.9

Количество кроликов	**Продукт выдерживает испытание при суммированном результате, не превышающем:**	**Продукт не выдерживает испытание при суммированном результате, превышающем:**
3	1,4^{0}C	2,2^{0}C
5	1,5 до 2,2^{o}C	3,7^{0}C

#Примечание: Испытание проводят поэтапно. На I этапе его выполняют на трех кроликах. Если необходим II этап, его выполняют на пяти кроликах.

2.6.9. АНОМАЛЬНАЯ ТОКСИЧНОСТЬ

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

Испытание проводят на здоровых белых мышах обоего пола массой 19-21 г, на которых ранее не проводили никаких испытаний.

ПОДГОТОВИТЕЛЬНЫЕ МЕРОПРИЯТИЯ

За 24 часа до испытания и во время его проведения животные должны находиться в помещении с постоянной температурой. За 2 часа до взвешивания и отбора животных для проведения испытания у них отбирается корм и вода.

ОБЩЕЕ ИСПЫТАНИЕ

Каждой из пяти здоровых мышей вводят внутривенно предписанное в частной статье количество субстанции, растворенное в 0,5 мл воды для инъекций или стерильного раствора хлорида натрия концентрацией 9 г/л. Если не предписано иное, раствор вводят в течение 15-30 секунд.

Мышь фиксируется на станке, в котором свободным остается только хвостик. Инъекция производится в хвостовую вену мыши.

Если в частной статье предусмотрен иной путь введения препарата мышам, объем раствора, вводимого в брюшную полость, под кожу или в желудок, может быть увеличен до 1 мл. Введение в желудок производят шприцем посредством инъекционной иглы, на конце которой имеется наплавленная олива, или при помощи другого приспособления, обеспечивающего поступление раствора или взвеси препарата в желудок.

Считают, что субстанция # и другие препараты # выдерживает испытание, если ни одна из мышей не погибает в течение 24 часов или времени, указанного в частной статье. Если погибает более одного животного, считают, что субстанция не выдерживает испытание. Если погибает одно животное, испытание повторяют. Считают, что препарат выдерживает испытание, если ни одна из мышей второй группы не погибает в течение указанного промежутка времени.

ПОВТОРНЫЕ ИСПЫТАНИЯ

В случае гибели одной мыши опыт повторяют на 5 мышах; в случае гибели при первоначальном испытании двух мышей повторное испытание проводят на 15 животных. Если при повторном испытании ни одна мышь не погибнет, т.е. суммарная гибель животных в двух опытах не превысит 10%, препарат считается выдержавшим испытание. В противном случае препарат бракуют.

ИММУННЫЕ СЫВОРОТКИ И ВАКЦИНЫ ДЛЯ МЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

Если не предписано иное, каждой из пяти здоровых мышей массой от 17 до 22 г внутрибрюшинно вводят одну человеческую дозу, но не более 1,0 мл. Человеческая доза указана на этикетке или листке-вкладыше испытуемого препарата. Животных наблюдают в течение 7 дней. Препарат выдерживает испытание, если ни одно из животных не обнаруживает признаков недомогания. Если погибает более одного животного, препарат не выдерживает испытание. Если одно из животных погибает или обнаруживает признаки недомогания, испытание повторяют. Препарат выдерживает испытание, если ни одно из животных второй группы не погибает и не обнаруживает признаков недомогания в течение указанного промежутка времени.

Испытание также должно быть проведено на двух здоровых морских свинках массой от 250 до 300 г. Внутрибрюшинно вводят каждому животному одну человеческую дозу, но не более 5,0 мл. Человеческая доза указана на этикетке или листке-вкладыше испытуемого препарата. Животных наблюдают в течение 7 дней. Препарат выдерживает испытание, если ни одно из животных не обнаруживает признаков недомогания. Если погибает более одного животного, препарат не выдерживает испытание. Если одно из животных погибает или обнаруживает признаки недомогания, испытание повторяют. Препарат выдерживает испытание, ес-

ли ни одно из животных второй группы не погибает и не обнаруживает признаков недомогания в течение указанного промежутка времени.

ИММУННЫЕ СЫВОРОТКИ И ВАКЦИНЫ ДЛЯ ВЕТЕРИНАРНОГО ПРИМЕНЕНИЯ

Если не предписано иное, каждой из пяти здоровых мышей массой от 17 до 22 г подкожно вводят 0,5 мл препарата. Животных наблюдают в течение 7 дней. Препарат выдерживает испытание, если ни одно из животных не показывает значительной локальной или системной реакции. Если погибает более одного животного, препарат не выдерживает испытание. Если одно из животных погибает или показывает значительную локальную или системную реакцию, испытание повторяют. Препарат выдерживает испытание, если ни одно из животных второй группы не погибает и не показывает значительной локальной или системной реакции в течение указанного промежутка времени.

Испытание также должно быть проведено на двух здоровых морских свинках массой от 250 до 300 г. Внутрибрюшинно вводят каждому животному не менее 2 мл препарата. Препараты, содержащие вспомогательные вещества, вводят подкожно. Животных наблюдают в течение 7 дней. Препарат выдерживает испытание, если ни одно из животных не показывает значительной локальной или системной реакции. Если погибает более одного животного, препарат не выдерживает испытание. Если одно из животных погибает или показывает значительную локальную или системную реакцию, испытание повторяют. Препарат выдерживает испытание, если ни одно из животных второй группы не погибает и не показывает значительной локальной или системной реакции в течение указанного промежутка времени.

2.6.10. ГИСТАМИН

Убивают морскую свинку массой от 250 до 350 г, которая была лишена пищи в течение предшествовавших 24 часов. Извлекают участок периферийной тонкой кишки длиной 2 см и опорожняют отделенную часть путем тщательной промывки раствором В, описанным ниже, с помощью шприца. К каждому из концов присоединяют тонкую нить и делают маленький поперечный разрез в центре фрагмента кишки. Помещают её в ванночку для органов, вместимостью от 10 до 20 мл, содержащую раствор В, поддерживаемый при постоянной температуре (от 34^0С до 36^0С), и пропускают через раствор смесь 95 частей кислорода и 5 частей диоксида углерода. Укрепляют одну из нитей рядом с дном ванночки для органов. Другую нить присоединяют к изотоническому миографу и регистрируют сокращения органа с помощью кимографа и другим подходящим способом непрерывной регистрации. Если используется рычаг, его длина должна быть такой, чтобы движение органа усиливались приблизительно в 20 раз. Натяжение кишки должно составлять около 9,8 мН (1 г) и быть отрегулировано в соответствии с чувствительностью органа. Промывают ванночку для органов раствором В. Выдерживают в течение 10 минут. Промывку раствором В повторяют еще 2 или 3 раза. Стимулируют серию сокращений путем добавления измеренных объемов от 0,2 до 0,5 мл раствора *гистамина дигидрохлорида R*, имеющего концентрцию, которая вызывает воспроизводимые субмаксимальные реакции. Эту дозу обозначают как «высокую дозу». Перед каждым добавлением гистамина ванночку для органов трижды промывают (предпочтительно, путем переполнения без опорожнения ванночки) раствором В. Последовательные добавления следует выполнять, соблюдая равные интервалы времени, достаточные для полной релаксации между добав-

лениями (около 2 минут). Добавляют равные объемы более разбавленного раствора *гистамина дигидрохлорида R*, приводящего к воспроизводимым реакциям, составляющим примерно половину от реакций, вызываемых «высокой дозой». Эту дозу обозначают как «малую дозу». Продолжают периодическое добавление «высоких» и «низких» доз раствора гистамина, следуя вышеуказанному, и чередуют каждое добавление с равным объемом разведения испытуемого раствора, регулируя степень разбавления таким образом, чтобы сокращение кишки, в случае его наличия, было меньшим, чем сокращение, вызываемое «высокой дозой» гистамина. Определяют, является ли сокращение, в случае его наличия, воспроизводимым и остаются ли реакции на «высокую» и «низкую» дозы гистамина неизменными. Вычисляют активность испытуемой субстанции, выраженную в ее эквиваленте на микрограмм основания гистамина, основываясь на определенном выше разведении.

Определенное таким образом количество не должно превышать количество, указанное в частной статье.

Если испытуемый раствор не вызывает сокращений, готовят свежий раствор, добавляя количество гистамина, соответствующее максимально допустимому в соответствии с требованиями частной статьи, и отмечают, соответствуют ли сокращения, вызываемые препаратом с добавкой гистамина, количеству добавленного гистамина. Если такого соответствия не наблюдается, или сокращение, вызываемое испытуемой субстанцией, не воспроизводимо, или последующие реакции на «высокие» и «низкие» дозы гистамина уменьшаются, то результаты испытания считают недостоверными и выполняют испытание на депрессорные вещества (*2.6.11*).

Раствор А

Натрия хлорид	160,0 г
Калия хлорид	4,0 г
Кальция хлорид, безводный	2,0 г
Магния хлорид, безводный	1,0 г
Натрия гидрофосфат додекагидрат	0,10 г
Вода для инъекций R	До 1000 мл

Раствор В

Раствор А	50,0 мл
Атропина сульфат	0,5 мг
Натрия гидрокарбонат	1,0 г
Глюкозы моногидрат	0,5 г
Вода для инъекций R	До 1000 мл

Раствор В должен быть свежеприготовленным, и его используют в течение 24 часов.

2.6.11. ДЕПРЕССОРНЫЕ ВЕЩЕСТВА

Испытание проводят на кошке массой не менее 2 кг, анестезированной с использованием хлоралозы или барбитурата, что позволяет поддерживать постоянное кровяное давление. Животное защищают от потери температуры тела и поддерживают ее таким образом, чтобы ректальная температура оставалась в физиологических пределах. В трахею вводят дыхательную трубку. В общую сонную артерию вводят канюлю, наполненную гепаринизированным раствором хлорида натрия концентрацией 9 г/л, и присоединяют ее к устройству, обеспечивающему постоянную регистрацию кровяного давления. В бедренную вену вводят другую канюлю, наполненную гепаринизированным раствором хлорида натрия концентрацией 9 г/л, через которую может быть введен раствор гистамина и испытуемого образца. Определяют чувствительность животного к гистамину путем внутривенного введения через равные промежутки времени раствора *гистамина R* в дозах, соответствующих 0,1 мкг и 0,15 мкг основания гистамина на килограмм массы тела. Введение меньшей дозы повторяют не менее трех раз. Вторую и последующие инъекции вводят не ранее, чем через одну минуту после того, как кровяное давление возвращается к уровню, наблюдавшемуся непосредственно перед предыдущей инъекцией. Животное используют в испытании только в случае, если получено четко регистрируемое снижение кровяного давления, являющееся постоянным для меньшей дозы, а большая доза вызывает более высокую реакцию. Испытуемое вещество растворяют в растворе хлорида натрия концентрацией 9 г/л или в другом растворителе, указанном в частной статье и взятом в количестве, достаточном для получения предписанной концентрации. Вводят внутривенно на килограмм массы тела 1,0 мл раствора *гистамина R*, затем две последовательные инъекции предписанного в частной статье количества испытуемого раствора и, наконец, 1,0 мл раствора *гистамина R*. Вторую, третью и четвертую инъекции вводят не ранее, чем через одну минуту после того, как кровяное давление возвращается к уровню, наблюдавшемуся непосредственно перед предыдущей инъекцией. Эти серии инъекций повторяют дважды и завершают испытание введением 1,5 мл раствора *гистамина R* на килограмм массы тела.

Если реакция на 1,5 мл раствора *гистамина R* на килограмм массы тела не превышает реакцию на 1,0 мл того же раствора, результаты испытания признают недостоверными. Испытуемый образец не выдерживает испытание, если среднее значение реакции на его введение превышает среднее значение реакции на 1,0 мл раствора *гистамина R* на килограмм массы тела, или если любая из доз образца вызвала более высокую депрессорную реакцию, чем завершающая доза раствора гистамина. Лабораторное животное не следует использовать в другом испытании на депрессорные вещества, если любая из испытанных доз вызывает более выраженную депрессорную реакцию, чем завершающая доза раствора гистамина, или если реакция на высокую дозу гистамина, введенную после испытуемой субстанции, менее среднего значения реакции на введенные ранее меньшие дозы гистамина.

Испытание на содержание веществ гистаминоподобного действия может быть проведено также в соответствии с нижеизложенным методом.

Испытание проводят на кошках обоего пола массой не менее 2 кг, анестезированной с использованием хлоралозы, зооксилазина, рометара или барбитурата, что позволяет поддерживать постоянное кровяное давление.

Для регистрации артериального давления в отпрепарированную сонную артерию вставляют канюлю, заполненную раствором, предупреждающим свертывание крови (насыщенный раствор натрия гидрокарбоната, 25% раствор магния

сульфата, раствор гепарина, содержащий 50 ЕД в 1 мл и др.) и соединяют ее с ртутным манометром. Запись давления производят на ленте кимографа.

Испытуемые растворы вводят внутривенно. Вначале проверяют чувствительность животного к гистамину. Для приготовления основного раствора гистамина, содержащего 1 мг гистамина-основания в 1 мл воды, около 138,1 мг (точная навеска) гистамина фосфата или около 82,8 мг (точная навеска) гистамина дигидрохлорида растворяю в 50 мл дистиллированной воды.

Раствор хранят не более 1 месяца в склянке из темного стекла с притертой пробкой в защищенном от света месте при температуре от 4 до 10^0С.

В качестве основного раствора гистамина можно использовать также 0,1% раствор гистамина дигидрохлорида в ампулах, в 1 мл которого содержится 0,6038 мг гистамина-основания.

Из основного раствора гистамина непосредственно перед опытом путем последовательных разведений в воде или в растворе натрия хлорида изотонического 0,9% для инъекций, в зависимости от растворителя для испытуемого препарата, указанного в соответствующей статье, готовят стандартные растворы, содержащие 0,5 и 1 мкг/мл гистамина-основания.

Для проверки реакции животного на гистамин в вену последовательно вводят указанные стандартные растворы с промежутками не менее 5 минут в дозах 0,1 и 0,2 мкг гистамина-основания в 0,2 мл на 1 кг массы. Скорость введения раствора 0,1 мл в секунду. Животных, у которых при введении гистамина в дозе 0,2 мкг на 1 кг массы артериальное давление снизится менее чем на 20 мм рт. ст., из опыта исключают.

После проверки чувствительности животного к гистамину уточняют величину гипотензивной реакции посредством повторного введения стандартного раствора гистамина в дозе 0,1 мкг (0,2 мл раствора) на 1 кг массы со скоростью 0,1 мл в секунду. Введение гистамина с интервалом 5 минут повторяют несколько раз, пока при двух последовательных введениях не будет получено одинаковое снижение артериального давления, которое принимается за стандартное в данных условиях опыта.

Затем с интервалом не менее 5 минут животному вводят испытуемый раствор лекарственного средства с той же скоростью, с которой вводили раствор гистамина.

Растворитель и концентрация испытуемого раствора (тест-доза) указаны в соответствующей фармакопейной статье.

Препарат считают выдержавшим испытание, если снижение артериального давления после введения тест-дозы не превышает реакции на введение 0,1 мкг/кг гистамина в стандартном растворе.

При испытании в одном опыте разных лекарственных средств необходимо проводить дополнительное определение реакции животного на введение стандартного раствора гистамина в дозе 0,1 мкг/кг. Отмеченная при этом величина реакции принимается за стандартную для последующего испытания препарата.

В случае значительного уменьшения величины реакции по сравнению с наблюдаемой в начале опыта необходимо вновь проверить чувствительность животного к действию гистамина в дозе 0,2 мкг/кг. Если снижение артериального давления при этом будет не менее 20 мм рт. ст., испытание препаратов продолжают в соответствии с указанными выше требованиями.

2.6.12. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ИСПЫТАНИЯ НЕСТЕРИЛЬНОЙ ПРОДУКЦИИ (СУММАРНОЕ КОЛИЧЕСТВО ЖИЗНЕСПОСОБНЫХ АЭРОБОВ)

Испытания, описанные ниже, позволяют осуществлять количественное определение мезофильных бактерий и грибов, способных расти в аэробных условиях.

Испытания предназначены прежде всего для того, чтобы определить, соответствует ли субстанция требованиям микробиологической чистоты, приведенным в частной статье. Если испытания проводят с этой целью, выполняют требования, изложенные ниже, включая количество образцов, отбираемых для анализа, и интерпретацию полученных результатов. Приведенные ниже методики могут быть также использованы при испытании эффективности антимикробных консервантов (*5.1.3*), в соответствии с Фармакопеей. Кроме того, их можно использовать при определении качества сырья и готовых лекарственных средств в соответствии с рекомендациями, изложенными в статье *«Микробиологическая чистота лекарственных средств»* (*5.1.4*). В этом случае, например, при определении производителем качества сырья и/или готовых лекарственных средств или при проведении проверки пригодности выбранной методики порядок проведения исследования, в том числе количество образцов, отбираемых для анализа, и интерпретацию полученных результатов производитель устанавливает при согласовании с компетентным уполномоченным органом.

Выполняют испытания в условиях, позволяющих избежать случайной контаминации испытуемого продукта. Меры предосторожности, предпринимаемые для предотвращения контаминации, не должны влиять ни на один из микроорганизмов, обнаруживаемых в ходе испытания. Если испытуемый продукт обладает антимикробной активностью, она должна быть подходящим образом нейтрализована. Если для этой цели используют инактиваторы, должна быть продемонстрирована их эффективность и нетоксичность в отношении микроорганизмов.

Если всвязи с природой лекарственного средства нельзя использовать метод мембранной фильтрации, а все вышеперечисленные методы устранения его антимикробного действия в отношении данного тест-штамма не эффективны, этот вид испытания не проводят.

Суммарное количество жизнеспособных аэробов определяют методом мембранной фильтрации, чашечным методом подсчета или методом последовательных разведений, в соответствии с указаниями в частной статье.

Допускается использование автоматизированных методов испытаний.

Метод наиболее вероятного числа предназначен для использования в тех случаях, когда другие методы использовать невозможно. При выборе метода испытания необходимо учитывать природу испытуемого лекарственного средства и ожидаемое количество микроорганизмов. Необходимо надлежащим образом провести проверку пригодности выбранной методики.

Если испытание проводится в соответствии с разделом *5.1.3* или *5.1.4*, следует использовать методы глубинного, поверхностного, двухслойного высева на чашки Петри или метод мембранной фильтрации.

ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦА

Порядок отбора проб. Отбор проб лекарственного средства необходимо проводить в строго определенном порядке. Порядок отбора проб зависит от объ-

ема серии, степени опасности для здоровья, связанной с микробным загрязнением лекарственного средства выше допустимого уровня, характеристиками лекарственного средства и ожидаемым уровнем микробного загрязнения. Если нет других указаний в частной статье, для испытания используют образцы по 10 г или 10 мл субстанции или лекарственного средства, отобранные с вышеупомянутыми мерами предосторожности. Образец (образцы) отбирают случайным образом из массы испытуемого материала или из контейнеров с лекарственным средством. Для отбора средней пробы, при необходимости, смешивают содержимое достаточного количества контейнеров для получения образца необходимой массы или объема, в зависимости от природы испытуемой субстанции или препарата.

Примером плана отбора проб является трехуровневый порядок пробоотбора, используемый для лекарственных средств с большой вероятностью неравномерного распределения микроорганизмов. Этот план предусматривает отбор от каждой серии пяти образцов, каждый из которых испытывают отдельно. При этом допускают, что в результате исследования могут быть выявлены образцы, характеризующиеся тремя уровнями микробного загрязнения: *(i)* – соответствующие образцы, содержащие меньше *m* колониеобразующих единиц (КОЕ) в грамме или миллилитре, где *m* – предельно допустимое количество микроорганизмов, установленное соответствующей частной статьей; *(ii)* – граничные образцы, содержащие в грамме или миллилитре больше *m*, но меньше 10*m* КОЕ; *(iii)* – бракованные образцы, содержащие больше 10*m* КОЕ в грамме или миллилитре.

Водорастворимые продукты. 10 г или 10 мл испытуемого продукта растворяют в буферизированном растворе хлорида натрия и пептона pH 7,0 или другой подходящей жидкости. Обычно готовят разведение в соотношении 1:10. Однако характеристики некоторых продуктов или требуемая чувствительность могут обусловить необходимость использования других соотношений. Если известно, что продукт обладает антимикробной активностью, к растворителю может быть добавлен инактивирующий агент. При необходимости доводят значение pH приблизительно до 7 и готовят серийные десятикратные разведения с использованием того же растворителя.

Нерастворимые в воде продукты, не относящиеся к жирам. 10 г или 10 мл испытуемого продукта суспендируют в буферизированом растворе хлорида натрия и пептона pH 7,0 или в другой подходящей жидкости. Обычно готовят разведение в соотношении 1:10, но характеристики некоторых продуктов могут обусловить необходимость использования больших объемов. Для облегчения суспендирования плохо смачиваемых субстанций может быть добавлен подходящий поверхностно-активный компонент, например, полисорбат 80 в количестве 1 г/л. Если известно, что продукт обладает антимикробной активностью, к растворителю может быть добавлен инактивирующий агент. При необходимости доводят значение pH приблизительно до 7 и готовят серийные десятикратные разведения с использованием того же растворителя.

Жиры. 10 г или 10 мл испытуемого продукта гомогенизируют с полисорбатом 80 или с другим подходящим стерильным поверхностно-активным агентом, взятым в количестве, не превышающем половины массы испытуемого образца, и при необходимости нагретым до температуры, не превышающей 40^{0}С, в исключительных случаях – 45^{0}С. Осторожно перемешивают, при необходимости поддерживая температуру с помощью водяной бани или инкубатора. Добавляют предварительно нагретый буферизированный раствор хлорида натрия и пептона pH 7,0 в количестве, достаточном для получения разведения исходного продукта в соотношении 1:10. Осторожно перемешивают, поддерживая температуру в течение минимального промежутка времени, необходимого для образования эмульсии, и в

любом случае не превышающего 30 минут. Дальнейшие серийные десятикратные разведения могут быть приготовлены с использованием буферизированного раствора хлорида натрия и пептона pH 7,0, содержащего стерильный полисорбат 80 или другой стерильный поверхностно-активный агент в подходящей концентрации.

Трансдермальные пластыри. Десять пластырей освобождают от защитного покрытия с помощью стерильного пинцета и помещают в стерильные пластмассовые или стеклянные лотки клейкой поверхностью вверх. При необходимости клейкую поверхность накрывают стерильной марлей или сеткой из полимерного моноволокна типа тканого фильтра и переносят 10 пластырей в емкость, вмещающую не менее 500 мл буферизированного раствора хлорида натрия и пептона pH 7,0, содержащего подходящий инактиватор, например, полисорбат 80 или лецитин. Энергично встряхивают не менее 30 минут (образец A). Другую группу из 10 пластырей готовят аналогичным образом и помещают в емкость, содержащую не менее 500 мл жидкой питательной среды D, и энергично встряхивают не менее 30 минут (образец B).

ИСПЫТАНИЕ ОБРАЗЦА

Мембранная фильтрация. Используют мембранные фильтры с номинальным размером пор, не превышающим 0,45 мкм, с установленной способностью к удерживанию бактерий. Тип фильтрующего материала выбирают таким образом, чтобы компоненты испытуемого образца не влияли на эффективность удерживания бактерий. Например, фильтры на основе нитрата целлюлозы используют для водных, масляных и разбавленных спиртовых растворов, а фильтры на основе ацетата целлюлозы – в частности, для растворов с высоким содержанием спирта. Конструкция аппарата для фильтрования должна обеспечивать перенос фильтра на питательную среду.

Подходящее количество образца, приготовленного в соответствии с указаниями раздела «Подготовка образца» (предпочтительно, соответствующее 1 г продукта, или меньшему количеству, если ожидается наличие большого числа колониеобразующих единиц), наносят на каждый из двух мембранных фильтров и немедленно фильтруют. Каждый фильтр промывают тремя порциями, приблизительно по 100 мл каждая, подходящей жидкости, например, буферизированного раствора хлорида натрия и пептона pH 7,0. К этому раствору могут быть добавлены поверхностно активные агенты, например, полисорбат-80, или инактиваторы антимикробных компонентов. Допускается проведение менее трех промывок, при условии проведения проверки пригодности такой методики. Один из мембранных фильтров, предназначенный преимущественно для подсчета бактерий, переносят на поверхность чашки с подходящей агаризованной средой, например, агаризованной средой B # или средой №1, а другой, предназначенный преимущественно для подсчета грибов, - на поверхность чашки с подходящей агаризованной средой, например, агаризованной средой C # или средой №2. Чашку с агаризованной средой B (# средой №1) инкубируют при температуре от 30^{0}C до35^{0}C, а чашку с агаризованной средой C (# средой №2) – при температуре от 20^{0}C до 25^{0}C в течение 5 дней, если за более короткое время не могут быть получены достоверные результаты. Выбирают чашки с максимальным количеством колоний менее 100 и вычисляют количество колониеобразующих единиц в грамме или миллилитре испытуемого продукта.

При испытании трансдермальных пластырей 50 мл образца A фильтруют по отдельности через каждый из двух стерильных мембранных фильтров. Одну мем-

брану помещают на агаризованную среду В # или среду №1 для определения общего числа аэробов, а другую мембрану – на агаризованную среду С # или среду №2 для подсчета грибов.

МЕТОДЫ ЧАШЕЧНОГО ПОДСЧЕТА

А. Метод глубинного посева. Используют чашки Петри диаметром 9 см. В каждую чашку помещают 1 мл образца, подготовленного в соответствии с указаниями раздела «Подготовка образца», и 15–20 мл расплавленной агаризованной среды, подходящей для культивирования бактерий (например, среды В или среды №1) или 15–20 мл расплавленной агаризованной среды, подходящей для культивирования грибов (например, среды С или среды №2), при температуре, не превышающей 45^{0}С. Если используются чашки Петри большего размера, то соответственно увеличивают количество агара. Готовят для каждой среды не менее двух чашек с каждым из разведений. Чашки инкубируют при температуре от 30^{0}С до 35^{0}С (от 20^{0}С до 25^{0}С для грибов) в течение 5 дней, если за более короткое время не могут быть получены достоверные результаты. Выбирают чашки, соответствующие одному разведению, на которых максимальное число колоний менее 300 (100 для грибов). Вычисляют среднее арифметическое значение числа колоний и определяют количество колониеобразующих единиц в грамме или миллилитре.

В. Метод поверхностного посева. Используют чашки Петри диаметром 9 см. В каждую чашку помещают 15–20 мл расплавленной агаризованной среды, подходящей для культивирования бактерий (например, среды В или среды №1) или 15–20 мл расплавленной агаризованной среды, подходящей для культивирования грибов (например, среды С или среды №2), при температуре около 45^{0}С и дают среде застыть. Если используются чашки Петри большего размера, то соответственно увеличивают количество агара. Чашки сушат, например, в условиях ламинарного потока воздуха или в инкубаторе. Отмеренный объем образца, подготовленного в соответствии с указаниями раздела «Подготовка образца», составляющий не менее 0,1 мл, распределяют по поверхности среды. Готовят для каждой среды не менее двух чашек с каждым из разведений. Инкубацию и подсчет количества колониеобразующих единиц производят в соответствии с вышеприведенными указаниями для метода глубинного высевания.

 # Двухслойный агаровый метод. 1 мл подготовленного продукта вносят в две пробирки с 4 мл расплавленной и охлажденной до 45^{0}С среды №1 (для определения количества бактерий). Содержимое пробирки быстро перемешивают, переносят в чашку Петри, содержащую 15-20 мл застывшей питательной среды №1, и равномерно распределяют по поверхности. Для количественного определения грибов поступают аналогичным способом, используя среду №2. Инкубирование посевов, подсчет колоний бактерий и грибов выполняют, как описано выше.

МЕТОД НАИБОЛЕЕ ВЕРОЯТНОГО ЧИСЛА

Метод наиболее вероятного числа (НВЧ) уступает по точности методам мембранной фильтрации и чашечного подсчета. Особенно недостоверными являются результаты подсчета плесневых грибов. Поэтому метод НВЧ следует применять лишь для подсчета бактерий в тех случаях, когда другие методы недоступны. Если применение данного метода обосновано, определение проводят в соответствии с нижеследующими указаниями.

Готовят ряд не менее, чем из трех последовательных десятикратных разведений продукта, в соответствии с указаниями раздела «Подготовка образца». Для каждого уровня разведения используют три аликвоты по 1 г или 1 мл для ино-

куляции трех пробирок, содержащих от 9 до 10 мл подходящей жидкой питательной среды (например, питательной среды А). При необходимости, к среде могут быть добавлены поверхностно-активные агенты (например, полисорбат 80) или инактиваторы антимикробных компонентов. Таким образом, для трех уровней разведения готовят для инокуляции девять пробирок. Все пробирки инкубируют при температуре от 30^0С до 35^0С в течение 5 дней. Для каждого уровня разведения записывают количество пробирок, в которых наблюдается микробный рост. Если природа испытуемого продукта приводит к получению неопределенных или трудно оцениваемых результатов, производят пересев на ту же жидкую среду или на подходящую агаризованную среду (например, агаризованную среду В), инкубируют при той же температуре от 18 до 24 часов и для подсчета используют полученные результаты. Наиболее вероятное количество микроорганизмов в грамме или миллилитре испытуемого продукта определяют по Таблице 2.6.12.-1.

Таблица *2.6.12.-1*

Наиболее вероятное число микроорганизмов

Три пробирки для каждого уровня разведения							
Количество пробирок с наблюдаемым ростом микроорганизмов			НВЧ в 1 г	Категория*		Пределы 95% доверительного интервала	
0,1 г	0,01 г	0,001 г		1	2		
0	0	0	< 3			-	-
0	1	0	3		×	< 1	17
1	0	0	3	×		1	21
1	0	1	7		×	2	27
1	1	0	7	×		2	28
1	2	0	11		×	4	35
2	0	0	9	×		2	38
2	0	1	14		×	5	48
2	1	0	15	×		5	50
2	1	1	20		×	8	61
2	2	0	21	×		8	63
3	0	0	23	×		7	129
3	0	1	38	×		10	180
3	1	0	43	×		20	210
3	1	1	75	×		20	280
3	2	0	93	×		30	390
3	2	1	150	×		50	510
3	2	2	210		×	80	640
3	3	0	240	×		100	1400
3	3	1	460	×		200	2400
3	3	2	1100	×		300	4800
3	3	3	> 1100			-	-

* Категория 1: Нормальные результаты, получаемые в 95% случаев.

Категория 2: Менее вероятные результаты, получаемые только в 4% случаев. Их не следует использовать при принятии важных решений. Результаты, еще менее вероятные, чем относящиеся к категории 2, не приводятся и всегда являются

неприемлемыми.

РОСТОВЫЕ СВОЙСТВА ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД И ПРОВЕРКА ПРИГОДНОСТИ МЕТОДИКИ ИСПЫТАНИЯ

В контейнерах с подходящей жидкой питательной средой (например, с питательным бульоном А) выращивают по отдельности бактериальные тест-культуры при температуре от 30^{0}С до 35^{0}С в течение 18–24 часов. На подходящих агаризованных средах (например, на среде С без антибиотиков # или среде №2) выращивают по отдельности тест-культуры грибов. *Candida albicans,* инкубируют при температуре от 20^{0}С до 25^{0}С в течение 48 часов, а *Aspergillus niger* – при температуре от 20^{0}С до 25^{0}С в течение 7 дней.

Staphylococcus aureus	например,	АТСС 6538 (NCIMB 9518, CIP 4.83)
	# или	АТСС 6538 Р
Escherichia coli	например,	АТСС 8739 (NCIMB 8545, CIP 53.126)
	# или	АТСС 25922
Bacillus subtilis	например,	АТСС 6633 (NCIMB 8054, CIP 52.62)
Candida albicans	например,	АТСС 10231 (NCPF 3179, IP 48.72),
	# или	АТСС 885-653
Aspergillus niger	например,	АТСС 16404 (IMI 149007, IP 1431.83)
	# или	ВКМ F-1119

Порции каждой из культур разбавляют буферизированным раствором хлорида натрия и пептона pH 7,0, получая тест-суспензии, содержащие около 100 жизнеспособных микроорганизмов в миллилитре. Используют суспензию каждого из микроорганизмов по отдельности в качестве контроля методов подсчета в присутствии и отсутствии испытуемого продукта. При проверке метода мембранной фильтрации или чашечного подсчета результат подсчета для каждого из тест-штаммов не должен отличаться более, чем в пять раз, от значения, вычисленного для посевного материала. При проверке метода наиболее вероятного числа значение, вычисленное для посевного материала, должно находиться в пределах 95% доверительного интервала для полученных результатов. Для проверки стерильности среды и растворителя, а также контроля условий асептики при проведении испытания, выполняют определение тем же методом с использованием в качестве испытуемого препарата стерильного буферизированного раствора хлорида натрия и пептона pH 7,0. Роста микроорганизмов наблюдаться не должно.

Тест-культуры бактерий можно выращивать на скошенной в пробирках плотной питательной среде подходящего состава, например, среде №1. Для получения тест-суспензии выращенные в пробирках культуры смывают раствором натрия хлорида 0,9% и разводят этим же раствором до нужного содержания клеток в миллилитре.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

За общее число бактерий принимают среднее количество колониеобразующих единиц, обнаруженных на агаризованной среде В # или среде №1. За общее число грибов принимают среднее количество колониеобразующих единиц,

обнаруженных на агаризованной среде С # или среде №2. Суммарное количество жизнеспособных аэробов представляет собой сумму числа бактерий и числа грибов, определенных выше. Если имеются доказательства роста на обеих средах микроорганизмов одинаковых типов, могут быть внесены соответствующие поправки. Если подсчет выполнен методом наиболее вероятного числа, то вычисленное значение представляет собой количество бактерий.

При использовании трехуровневого плана отбора проб поступают следующим образом.

Определяют общее число микроорганизмов отдельно для каждого из пяти образцов. Считают, что субстанция или готовое лекарственное средство удовлетворяет требованиям по микробиологической чистоте, если выполняются следующие условия:

(i) – общее число микроорганизмов, определенное для каждого испытуемого образца, не превышает допустимый уровень больше чем в 10 раз (отсутствуют бракованные образцы),

(ii) – не более чем для двух испытуемых образцов общее число микроорганизмов, определенное в результате испытания, находится в интервале между допустимым уровнем и десятикратным значением (то есть не более двух предельных образцов).

Использование трехуровневого плана отбора проб должно быть предусмотрено в частной статье.

Если в частной статье предписано максимальное значение, оно должно интерпретироваться следующим образом:

10^2 микроорганизмов – максимально допустимое значение: $5x10^2$;

10^3 микроорганизмов – максимально допустимое значение: $5x10^3$; и т.д.

Если при испытании образца методом мембранной фильтрации при разведении лекарственного средства 1:10 не выявлен рост микроорганизмов на мембранных фильтрах, результаты выражают следующим образом: «В 1 г (мл) лекарственного средства (сырья) бактерии (грибы) не выявлены».

В том случае, если при испытании образца методом высева на чашки при разведении лекарственного средства 1:10 не выявлен рост микроорганизмов на чашках, результаты отмечают следующим образом: «В 1 г (мл) лекарственного средства (сырья) менее 10 бактерий».

Если в частной статье приведены допустимые пределы содержания микроорганизмов, результаты интерпретируют следующим образом:

10^2 микроорганизмов – максимально допустимое значение: $1x10^2$;

10^3 микроорганизмов – максимально допустимое значение: $1x10^3$; и т.д.

Рекомендуемые растворы и питательные среды описаны в общем разделе *2.6.13.*

2.6.13. МИКРОБИЛОГИЧЕСКИЕ ИСПЫТАНИЯ НЕСТЕРИЛЬНОЙ ПРОДУКЦИИ (ИСПЫТАНИЯ НА НАЛИЧИЕ СПЕЦИФИЧЕСКИХ МИКРООРГАНИЗМОВ)

Методики, изложенные в данной статье, допускают использование селективных питательных сред, которые не позволяют выделять микроорганизмы с сублетальными повреждениями. Так как для обеспечения качества лекарственного средства необходимо выявлять микроорганизмы с сублетальными повреждениями, следует предусмотреть проведение процедуры восстановления их жизнеспособности перед использованием селективных питательных сред.

Если испытуемый продукт обладает антимикробной активностью, она должна быть соответствующим способом нейтрализована.

Допускается использование автоматизированных методов испытаний, если в результате проверки пригодности было доказано, что они имеют результаты, идентичные описанным ниже методам. Для биохимической идентификации микроорганизмов могут быть использованы готовые тест-системы.

Энтеробактерии и некоторые другие грамотрицательные бактерии

Испытание предназначено для определения бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, но также позволяет определять и другие типы микроорганизмов (например, *Aeromonas, Pseudomonas*).

Определение наличия бактерий. Готовят испытуемый продукт в соответствии с указаниями, приведенными в разделе *2.6.12*, но с использованием питательного бульона D вместо буферизированного раствора хлорида натрия и пептона pH 7,0, гомогенизируют и инкубируют при 35-37^{0}С в течение промежутка времени, достаточного для оживления бактерий и недостаточного для инициирования их размножения (обычно 2 часа, но не более 5 часов). Контейнер встряхивают, переносят количество содержимого [гомогенат (а)], соответствующее одному грамму или одному миллилитру продукта, в 100 мл обогащенного питательного бульона E и инкубируют при 35-37^{0}С в течение 18-48 часов. Пересевают на чашки с агаризованной средой F. Инкубируют при 35-37^{0}С в течение 18-24 часов. Продукт выдерживает испытание, если ни на одной из чашек не наблюдается рост грамотрицательных бактерий.

10 мл испытуемого образца, подготовленного, как описано в разделе *2.6.12*, но с использованием среды №11 вместо буферного раствора с натрия хлоридом и пептоном pH 7,0, вносят в 100 мл питательной среды № 3, перемешивают и инкубируют при температуре от 30 до 35°С в течение 24 - 48 ч. При наличии роста делают пересев на среду № 4 в чашке Петри. Посевы инкубируют при температуре 30 - 35°С в течение 24 - 48 ч. Наличие роста малиновых с металлическим блеском или без него; розовых, бесцветных, блестящих, выпуклых колоний грамотрицательных палочек указывает на возможное загрязнение лекарственного средства бактериями сем. *Enterobacteriaceae* и некоторыми другими грамотрицательными бактериями. Выросшие колонии пересевают, каждую отдельно, со среды № 4 на скошенную в пробирках среду № 1 и выращивают при температуре 30 - 35°С течение 18 - 20 ч. Из каждой пробирки с чистой культурой делают пересевы на среды № 6 и № 7.

После посева в половину пробирок со средой № 6 вносят по 0,5 мл стерильного вазелинового масла. Все посевы инкубируют при температуре 30 - 35°С в течение 18 – 20 ч. Ферментацию глюкозы устанавливают по изменению цвета среды № 6 из красного в желтый в пробирках с маслом и без него. О наличии нитритов в среде № 7 судят по появлению красного окрашивания при внесении в среду реактива Грисса. Параллельно исследуют чистые культуры на наличие фермента цитохромоксидазы. Если в образце обнаружены грамотрицательные

неспорообразующие палочки, которые дают отрицательную оксидазную реакцию, ферментируют глюкозу с образованием кислоты (или кислоты и газа) и восстанавливают нитраты в нитриты, лекарственное средство контаминировано бактериями семейства *Enterobacteriaceae.*

 # Тест на цитохромоксидазу. Полоску фильтровальной бумаги смачивают реактивом и наносят стеклянной палочкой суточную чистую культуру исследуемых бактерий со среды №1. Синее окрашивание, появляющееся через 2-5 мин, свидетельствует о положительной оксидазной реакции.

Количественная оценка. Инокулируют подходящие количества питательного бульона E гомогенатом (а) и/или его разбавлениями, содержащими, соответственно, 0,1г, 0,01 г и 0,001 г (или 0,1 мл, 0,01 мл и 0,001 мл) испытуемого продукта. Инкубируют при температуре 35-37^{0}C в течение 24-48 часов. Каждую из культур пересевают на чашку с агаризованной средой F для достижения селективного разделения. Инкубируют при температуре 35-37^{0}C в течение 18-24 часов. Рост хорошо развитых колоний грамотрицательных бактерий, обычно красной или красноватой окраски, представляет собой положительный результат. Отмечают наименьшее количество продукта, дающее положительный результат, и наибольшее количество, дающее отрицательный результат. Вероятное количество бактерий определяют по таблице *2.6.13.-1*.

Инокулируют подходящие количества среды №3 гомогенатом и /или его разбавлениями, содержащими, соответственно, 0,1 г, 0,01 г и 0,001 г (или 0,1 мл, 0,01 мл и 0,001 мл) испытуемого продукта. Инкубируют при температуре 30 - 35^{0}C в течение 24 – 48 ч. При наличии роста делают пересев на плотную среду №4 (агар Эндо) и инкубируют при той же температуре в течение 18-24 ч. В случае появления характерных для *Enterobacteriaceae* колоний грамотрицательных палочек определяют количество энтеробактерий в 1 г или в 1 мл образца по Таблице *2.6.13.-1*.

Таблица 2.6.13.-1.

Результаты для каждого количества продукта			Вероятное количество бактерий в грамме продукта
0,1 г или 0,1 мл	0,01 г или 0,01 мл	0,001 г или 0,001 мл	
+	+	+	Более 10^3
+	+	-	Менее 10^3, но более 10^2
+	-	-	Менее 10^2, но более 10
-	-	-	Менее 10

При испытании трансдермальных пластырей 50 мл образца B пропускают через стерильный мембранный фильтр, как описано в разделе *2.6.12.*, помещают мембрану в 100 мл обогащенной питательной среды E и инкубируют при температуре 35–37 ^{0}C 18–24 часа. После окончания инкубации делают пересев на по-

верхность агаризованной среды F для выявления энтеробактерий и других грамотрицательных микроорганизмов.

Escherichia coli

Испытуемый продукт готовят в соответствии с указаниями общего раздела *2.6.12*. 10 мл образца или количество, представляющее 1 г или 1 мл продукта, помещают в 100 мл питательного бульона A, гомогенизируют и инкубируют при 35-37^{0}С в течение 18-48 часов. Контейнер встряхивают, переносят 1 мл содержимого в 100 мл питательной среды G и инкубируют при 43-45^{0}С в течение 18-24 часов. Пересевают на чашки с агаризованной средой H и инкубируют при 35-37^{0}С в течение 18-72 часов. Рост красных, немукоидных колоний грамотрицательных палочек указывает на возможное присутствие *E.coli.* Для подтверждения проводят соответствующие биохимические тесты, например, по образованию индола. Продукт выдерживает испытание, если подобные колонии не обнаруживаются или подтверждающие биохимические реакции дают отрицательный результат.

10 мл образца в питательной среде №11 или количество, представляющее 1 г или 1 мл продукта, подготовленное и инкубированное как описано в разделе «Энтеробактерии и некоторые другие грамотрицательные бактерии. Количественная оценка», помещают в 100 мл питательной среды №3 и инкубируют при температуре 30-35^{0}С в течение 18-24 часов Пересевают на среду № 4 и инкубируют при температуре 30 - 35°С в течение 18-24 часов. На среде № 4 *E.coli* образуют, как правило, характерные малиновые колонии с металлическим блеском или без него, диаметром 2-4 мм. Подозрительные на принадлежность к *E.coli* колонии микроскопируют. При обнаружении грамотрицательных палочек отсевают на скошенную в пробирках плотную среду №1 и инкубируют при температуре 30 - 35°С в течение 18-24 часов. Из каждой пробирки с чистой культурой делают пересевы на среды №14 (агар Симмонса) и №15 (бульон Хоттингера), а также используют для теста на цитохромоксидазу. Через 18-24 часа инкубации при 30 - 35°С отмечают бактериальный рост или его отсутствие на средах № 14 и № 15. Утилизацию цитрата устанавливают по изменению цвета среды №14 из зеленого в синий. Наличие индола определяют по появлению красного кольца на поверхности среды № 15 при добавлении реактива Ковача или Эрлиха.

Если в образце обнаружены грамотрицательные неспорообразующие палочки, не обладающие ферментом цитохромоксидазой, не утилизирующие цитрат натрия и образующие индол, считают, что лекарственное средство контаминировано *E. coli.*

Salmonella

Испытуемый продукт готовят в соответствии с указаниями общего раздела *2.6.12*, но с использованием питательного бульона A вместо буферизированного раствора хлорида натрия и пептона pH 7,0, гомогенизируют и инкубируют при 35-37^{0}С в течение 18-24 часов. 1 мл обогащенной культуры переносят в 10 мл питательного бульона I и инкубируют при 41-43^{0}С в течение 18-24 часов. Пересевают не менее чем на две различные агаризованные среды, выбранные из агаризованных сред J, K и L. Инкубируют при 35-37^{0}С в течение 18-72 часов. На возможное присутствие сальмонелл указывает рост культур, имеющих следующие характерные признаки:

Агаризованная среда J: хорошо развитые бесцветные колонии.
Агаризованная среда K: хорошо развитые красные или красные с черным цен-

	тром колонии.
Агаризованная среда L:	маленькие прозрачные бесцветные или обладающие окраской от розовой до белой колонии, часто окруженные зоной розового или красного цвета.

Несколько подозрительных колоний переносят по отдельности на агаризованную среду M в пробирках с использованием поверхностной и глубинной инокуляции. Присутствие сальмонелл предварительно подтверждается, если имеется изменение окраски из красной в желтую и, как правило, газообразование в случае глубинной, но не поверхностной инокуляции. При этом в агаре может образовываться сероводород. Окончательный вывод делают на основе соответствующих биохимических и серологических испытаний. Продукт выдерживает испытание, если культура описанного типа не обнаруживается или подтверждающие биохимические и серологические испытания дают отрицательный результат.

1 мл обогащенной культуры на среде № 3 вносят в пробирку с 10 мл среды № 12 (селенитовая среда) и инкубируют при 30 - 35°С в течение 16-18 часов. Делают пересев петлей на среду № 5 (висмут-сульфит агар) и инкубируют при температуре 30 - 35°С в течение 24 - 48 часов. На среде № 5 *Salmonella* образует, как правило, типичные черные колонии с характерным металлическим блеском, при этом участок среды под колонией прокрашивается в черный цвет. Подозрительные на принадлежность к *Salmonella* колонии микроскопируют и, при обнаружении в мазках грамотрицательных палочек, отсевают на среду №13 (трехсахарный агар с солями железа), нанося небольшое количество культуры петлей сначала на скошенную часть агара, а потом уколом в столбик. Параллельно ставят тест на цитохромоксидазу, используя чистую культуру с плотной среды № 1. Через 18-24 часа инкубации при 30 – 35^{0}С отмечают изменение цвета среды из красного в желтый только в столбике питательной среды. Почернение среды свидетельствует об образовании сероводорода.

Если в образце обнаружены грамотрицательные неспорообразующие палочки, не обладающие ферментом цитохромоксидаза, не ферментирующие сахарозу и лактозу и выделяющие сероводород, считают, что лекарственное средство контаминировано *Salmonella.*

Pseudomonas aeruginosa

Испытуемый продукт готовят в соответствии с указаниями общего раздела *2.6.12*. 10 мл образца или количество, соответствующее 1 г или 1 мл продукта, помещают в 100 мл питательного бульона А, гомогенизируют и инкубируют при 35-37^{0}С в течение 18-48 часов. Пересевают на чашки с агаризованной средой N и инкубируют при 35-37^{0}С в течение 18-72 часов. Если рост микроорганизмов не наблюдается, то продукт выдерживает испытание. Если имеется рост колоний грамотрицательных палочек, выполняют пересев некоторого количества различающихся по морфологическим признакам изолированных колоний на питательный бульон А и инкубируют при 41-43^{0}С в течение 18-24 часов. Продукт выдерживает испытание, если при 41-43^{0}С роста не происходит.

При испытании трансдермальных пластырей 50 мл образца А пропускают через стерильный мембранный фильтр в соответствии с указаниями общего раздела *2.6.12*, помещают мембранный фильтр в 100 мл жидкой среды А и инкубируют при температуре 35-37^{0}С в течение 18-48 часов. После окончания периода инкубации пересевают на поверхность агаризованной среды N.

Образец в количестве 10 г (мл) вносят в 100 мл питательной среды № 8, перемешивают и инкубируют при температуре 30 - 35°С в течение 24 - 48 часов. Делают пересев на чашку с плотной питательной средой №9 и инкубируют при температуре 30-35^{0}С от 18 до 48 часов. Рост зеленоватых, как правило, флюоресцирующих колоний, голубых в ультрафиолетовом свете (что свидетельствует о наличии пигмента пиоцианина) указывает на возможность загрязнения лекарственного средства *Pseudomonas aeruginosa*. В этом случае подозрительные колонии пересевают на скошенную плотную среду №1, инкубируют при температуре 30-35^{0}С в течение 18-24 часов. Выросшие колонии микроскопируют и, при выявлении грамотрицательных палочек, проводят тест на наличие фермента цитохромоксидаза. Если в образце обнаружены грамотрицательные неспорообразующие палочки, которые дают положительную оксидазную реакцию и образуют сине-зеленый пигмент, лекарственное средство контаминировано *Pseudomonas aeruginosa.*

Staphylococcus aureus

Испытуемый продукт готовят в соответствии с указаниями общего раздела *2.6.12*. 10 мл образца или количество, соответствующее 1 г или 1 мл продукта, помещают в 100 мл питательного бульона А, гомогенизируют и инкубируют при 35-37^{0}С в течение 18-48 часов. Пересевают на чашку с агаризованной средой О и инкубируют при 35-37^{0}С в течение 18-72 часов. Наличие черных колоний грамположительных кокков, окруженных прозрачными зонами, свидетельствует о присутствии *S. aureus.* Подтверждение может быть получено путем проведения соответствующих биохимических тестов, например, на коагулазу и дезоксирибонуклеазу. Продукт выдерживает испытание, если культура описанного типа на агаризованной среде О не обнаруживается или подтверждающие биохимические испытания дают отрицательный результат.

При испытании трансдермальных пластырей 50 мл образца А пропускают через стерильный мембранный фильтр в соответствии с указаниями общего раздела *2.6.12*, помещают мембранный фильтр в 100 мл жидкой среды А и инкубируют при температуре 35-37^{0}С в течение 18-48 часов. После окончании периода инкубации пересевают на поверхность агаризованной среды О.

Образец в количестве 10 г (мл) вносят в 100 мл питательной среды № 8, перемешивают и инкубируют при температуре 30-35°С в течение 24 - 48 часов. Делают пересев на чашку с плотной питательной средой №10 и инкубируют при температуре 30-35^{0}С от 18 до 48 часов. Рост золотисто-желтых колоний, окруженных желтыми зонами (что свидетельствует о ферментации маннита), указывает на возможность загрязнения лекарственного средства *S. aureus*. В этом случае подозрительные колонии пересевают на скошенную плотную среду №1, инкубируют при температуре 30-35^{0}С в течение 18-24 часов. Выросшие колонии микроскопируют и, при выявлении грамотрицательных кокков, расположенных гроздьями, проводят тест на наличие фермента плазмокоагулаза.

 # Тест на наличие плазмокоагулазы (реакция плазмокоагуляции) Кровь, взятую стерильным шприцем из сердца кролика, помещают в 5 % стерильный раствор натрия цитрата, отсасывают плазму, разводят 1:5 0,9% стерильным раствором натрия хлорида изотоническим и разливают по 0,5 мл в стерильные пробирки. В каждую пробирку помещают 1 петлю суточной культуры стафилококка и инкубируют при температуре от 30 до 35°С в течение 4 - 6 часов. Если в течение этого времени не наблюдают свертывание плазмы, реакцию плазмокоагуляции считают отрицательной. Обязательно наличие двух контролей: 1) контроль рас-

твора плазмы, 2) контроль культуры стафилококка, обладающего ферментом коагулазой.

Допускается использовать сухую кроличью цитратную плазму промышленного производства, которую разводят согласно наставлению по применению.

Если в образце обнаружены грамположительные кокки, которые ферментируют маннит и дают положительную реакцию плазмокоагуляции, лекарственное средство контаминировано Staphylococcus aureus

Клостридии

Нижеописанные испытания проводят в различных целях. Первый метод предназначен для тех случаев, когда важным является исключение патогенных клостридий, и необходимо провести испытание на их отсутствие. Эти продукты обычно содержат небольшое общее количество микроорганизмов. Второй метод представляет собой полуколичественное определение *Clostridium perfringens,* и предназначен для продуктов, в которых количество этих микроорганизмов является критерием качества.

1. Испытание на клостридии. Готовят испытуемый продукт, как описано в разделе *2.6.12*. Отбирают две равные порции, соответствующие 1 г или 1 мл продукта. Одну из порций нагревают при 80^{0}С в течение 10 минут и быстро охлаждают. Другую порцию не нагревают. По 10 мл каждой из гомогенизированных порций переносят в две пробирки (38x200 мм) или в другие подходящие контейнеры, содержащие 100 мл среды P. Инкубируют в анаэробных условиях при 35-37^{0}С в течение 48 часов. После инкубации делают пересев из каждой пробирки на среду Q с добавлением гентамицина и инкубируют в анаэробных условиях при 35-37^{0}С в течение 48 часов. Если роста микроорганизмов не наблюдается, продукт выдерживает испытание.

При наличии роста делают пересев каждой отдельной колонии на питательную среду Q без гентамицина и инкубируют как в аэробных, так и в анаэробных условиях. Наличие только анаэробного роста грамположительных палочек (с эндоспорами или без них), дающих отрицательную реакцию на каталазу, указывает на присутствие *Clostridium* spp*.* При необходимости сравнивают морфологию колоний на двух чашках и проводят испытания на каталазу для исключения аэробных и факультативно анаэробных *Bacillus* spp, дающих положительную реакцию на каталазу. Это испытание может применяться к изолированным колониям на агаре или после их переноса на предметное стекло, путем добавления капли разбавленного раствора пероксида водорода R. Образование пузырьков газа является признаком положительной реакции на каталазу.

2. Количество Clostridium perfringens. Используя продукт, подготовленный в соответствии с указаниями раздела *2.6.12*, готовят разведения в соотношениях 1:100 и 1:1000 в буферизированном растворе хлорида натрия и пептона pH 7,0. Определяют наиболее вероятное число бактерий, как описано в разделе *2.6.12*, используя питательную среду R в пробирках или других подходящих контейнерах с помещенной внутрь маленькой трубкой Дюрама. Перемешивают при минимальном встряхивании и инкубируют при 45,5-46,5^{0}С в течение 24-48 часов. Наличие в пробирках черного окрашивания, вызванного образованием сульфида железа, и сильного газообразования в трубках Дюрама (не менее 1/10 объема) указывает на присутствие *Cl. perfringens*. Наиболее вероятное количество *C. perfringens* оценивают с использованием Таблицы *2.6.13.-2*.

Таблица 2.6.13.-2

Наиболее вероятное число (НВЧ) бактерий

Три пробирки для каждого уровня разведения							
Количество пробирок с наблюдаемым ростом микроорганизмов			НВЧ в 1 г	Категория*		Пределы 95% доверительного интервала	
0,1 г	0,01 г	0,001 г		1	2		
0	0	0	< 3			-	-
0	1	0	3		×	< 1	17
1	0	0	3	×		1	21
1	0	1	7		×	2	27
1	1	0	7	×		2	28
1	2	0	11		×	4	35
2	0	0	9	×		2	38
2	0	1	14		×	5	48
2	1	0	15	×		5	50
2	1	1	20		×	8	61
2	2	0	21	×		8	63
3	0	0	23	×		7	129
3	0	1	38	×		10	180
3	1	0	43	×		20	210
3	1	1	75	×		20	280
3	2	0	93	×		30	390
3	2	1	150	×		50	510
3	2	2	210		×	80	640
3	3	0	240	×		100	1400
3	3	1	460	×		200	2400
3	3	2	1100	×		300	4800
3	3	3	> 1100			-	-

* Категория 1: Нормальные результаты, получаемые в 95% случаев.

Категория 2: Менее вероятные результаты, получаемые только в 4% случаев. Их не следует использовать при принятии важных решений. Результаты, еще менее вероятные, чем относящиеся к категории 2, не приводятся и всегда являются неприемлемыми.

Контроль. Используют следующие тест-штаммы:

Для метода 1: *Clostridium sporogenes,* например, ATCC 19404 (NCTC 532) или CIP 79.3; # ГИСК 272

Для метода 2: *Clostridium perfringens,* например, ATCC 13124 (NCIMB 6125 и NCTC 8237, CIP 103 409).

При необходимости, комбинируют с *Cl. sporogenes* для проверки селективности и анаэробных условий.

Ростовые свойства питательных сред и проверка пригодности методики испытания

Описанные ниже испытания следует проводить, как минимум, для каждой партии сухой питательной среды.

В пробирках с подходящими средами (например, указанными ниже) выращивают по отдельности нижеприведенные тест-культуры при температуре 30-35^{0}С в течение 18–24 часов.

Staphylococcus aureus	например, # или	АТСС 6538 (NCIMB 9518, CIP 4.83) АТСС 6538 Р питательный бульон А, # жидкая среда №1
Pseudomonas aeruginosa	например,	АТСС 9027 (NCIMB 8626, CIP 82.118) питательный бульон А, # жидкая среда №1
Escherichia coli	например, # или	АТСС 8739 (NCIB 8545, CIP 53.126), АТСС 25922 питательный бульон А, # жидкая среда №1
Salmonella typhimurium		Рекомендации по конкретным штаммам отсутствуют. Может быть также использован штамм не патогенный для человека, например, *Salmonella abony (*NCTC 6017, CIP 80.39); питательный бульон А, # жидкая среда №1

Порции каждой из культур разбавляют буферизированным раствором хлорида натрия и пептона рН 7,0, получая тест-суспензии, содержащие около 1000 жизнеспособных микроорганизмов в миллилитре. Смешивают равные объемы каждой суспензии и используют 0,4 мл полученной смеси (приблизительно 100 микроорганизмов каждого штамма) в качестве инокулята для проведения испытаний на *E.coli, Salmonella, Ps. aeruginosa* и *S. aureus,* при необходимости, в присутствии и в отсутствии испытуемого продукта. Для соответствующих микроорганизмов должен быть получен положительный результат.

Тест-культуры можно выращивать на скошенной в пробирках плотной питательной среде подходящего состава, например, среде №1. Для получения тест-суспензий выращенные в пробирках культуры смывают раствором натрия хлорида 0,9% и разводят этим же раствором до нужного содержания клеток в миллилитре, используя стандарт мутности.

 # Определение антимикробного действия нестерильных лекарственных средств

Определение антимикробного действия нестерильных лекарственных средств можно проводить с использованием следующих тест-микроорганизмов:

Bacillus cereus	АТСС 10702 (NCTC 8035)
Escherichia coli	АТСС 25922
Pseudomonas aerugiosa	ГИСК 453, АТСС 9027
Staphylococcus aureus	АТСС 6538-Р (FDA 209-P)
Candida albicans	АТСС 885-653

Aspergillus niger		ВКМ F-1119

Проведение испытания

Перед определением антимикробного действия культуры бактерий отсевают на скошенную в пробирках плотную питательную среду №1 и инкубируют при температуре от 30^{0}С до 35^{0}С в течение 18-24 часов.

Культуры грибов выращивают на скошенной плотной питательной среде №2 при температуре от 20^{0}С до 25 ^{0}С, C. albicans – 48 часов, A. niger – 7 суток.

Со скошенного агара культуры бактерий и C. albicans смывают раствором натрия хлорида 0,9%, культуру A. niger – этим же раствором с 0,05% полисорбата 80. Полученные суспензии разводят до концентрации 10^3 КОЕ/мл для культур бактерий и 10^3 – 10^4 КОЕ/мл для культур грибов.

Определение антимикробного действия для водорастворимых лекарстенных средств

Готовят разведения лекарственного средства 1:10; 1:20; 1:50 (при необходимости ряд разведений может быть продолжен), используя фосфатный буферный раствор (для приготовления эмульсий в раствор добавляют не более 5 % полисорбата 80).

Каждое разведение лекарственного средства вносят по 1 мл в чашки Петри диаметром 90 мм, в одни из которых добавляют по 0,2 мл взвеси культуры B. cereus, а в другие – по 0,2 мл культуры C. albicans и A. niger. В чашки с B. cereus вносят по 15-20 мл расплавленной среды № 1 при температуре (45 - 50) ^{0}С, в чашки с культурами C. albicans и A. niger – то же количество среды № 2.

Каждое разведение лекарственного средства вносят по 1 мл в пробирки с 10 мл жидкой среды - № 3 и № 8. В пробирки со средой № 3 добавляют по 1 мл взвеси культуры E.coli, в пробирки со средой № 8 – по 1 мл взвеси культур P.aeruginosa и S.aureus, каждую отдельно. В контрольные чашки и пробирки вместо разведения лекарственного средства вносят такое же количество буферного раствора.

Посевы на средах № 1, 3, 8, инкубируют при температуре от 30^{0}С до 35 ^{0}С в течение 2 суток (среды № 3, № 8) и 5 суток (среда № 1). Посевы на среде № 2 инкубируют при температуре от 20^{0}С до 25^{0}С в течение 5 суток. В случае, если при внесении лекарственного средства в жидкие питательные среды (№ 3, № 8) образуется помутнение, препятствующее учету результатов, делают пересев со среды № 3 на среду № 4 (агар Эндо), а со среды № 8 – на среды № 9 и № 10. При росте типичных колоний E.coli (среда № 4), P.aeruginosa (среда № 9) и S.aureus (среда № 10) отмечают наличие роста тест-микроорганизма.

Определение антимикробного действия для водонерастворимых лекарственных средств (метод репликаций).

В стерильные чашки Петри вносят по 1 мл каждого разведения исследуемого лекарственного средства. В контрольные чашки вносят по 1 мл растворителя, который используют для получения разведения. В чашки Петри (как в эксперименте, так и в контроле) добавляют по 15-20 мл расплавленной и охлажденной до (45 - 50) ^{0}С среды № 1, в другие – такое же количество среды № 2 и быстро пере-

мешивают. После застывания агара чашки подсушивают для удаления конденсата с поверхности среды.

На поверхность агара бактериологической петлей или репликатором наносят бляшками инокулят каждого тест-штамма бактерий и грибов на среды № 1 и № 2 соответственно.

Чашки со средой № 1 инкубируют при температуре от 30^0С до 35^0С в течение 48 часов. Чашки со средой № 2 инкубируют при температуре от 20^0С до 25^0С в течение 3-5 суток.

Учет результатов

После окончания сроков инкубации посевов (появление типичного роста тест-микроорганизмов в контрольных чашках без лекарственного средства) отмечают наличие или отсутствие роста тест-штаммов бактерий и грибов на средах, в которые вносили различные разведения лекарственного средства.

Отсутствие роста тест-микроорганизма на среде с препаратом свидетельствует о том, что исследуемый препарат в данном разведении обладает антимикробным действием в отношении определенного тест-микроорганизма.

НЕЙТРАЛИЗУЮЩИЕ АГЕНТЫ

Для нейтрализации активности антимикробных компонентов могут использоваться нейтрализующие агенты. Они могут быть добавлены к буферизированному раствору хлорида натрия и пептона pH 7,0, предпочтительно, перед стерилизацией. В случае применения нейтрализующих агентов должна быть показана их эффективность и нетоксичность в отношении микроорганизмов.

Типичная нейтрализующая жидкость имеет следующий состав:

Полисорбат 80	30 г
Лецитин (яичный)	3 г
Гистидина гидрохлорид	1 г
Пептон (мясной или казеиновый)	1 г
Натрия хлорид	4,3 г
Калия дигидрофосфат	3,6 г
Натрия гидрофосфата дигидрат	7,2 г
Вода очищенная	1000 мл

Раствор стерилизуют в паровом стерилизаторе при 121^0С в течение 15 мин.

Если нейтрализующая способность раствора недостаточна, концентрация полисорбата 80 или лецитина может быть увеличена. Кроме того, могут быть добавлены нейтрализаторы, перечисленные в Таблице *2.6.13.-3*.

Таблица 2.6.13.-3

Инактиваторы антимикробных агентов, добавляемые к буферизированному раствору хлорида натрия и пептона pH 7,0

Тип антимикробного агента	Инактиватор	Концентрация	Комментарий

Фенолы	Натрия лаурил-сульфат	4 г/л	Добавляют после стерилизации буферизированного раствора хлорида натрия и пептона pH 7,0
	Полисорбат 80 и лецитин	30 г/л и 3 г/л	
	Яичный желток	5 мл/л – 50 мл/л	
Ртутьорганические соединения	Натрия тиогликолят	0,5 г/л – 5 г/л	
Галогены	Натрия тиосульфат	5 г/л	
Четвертичные аммониевые соединения	Яичный желток	5 мл/л – 50 мл/л	Добавляют после стерилизации буферизированного раствора хлорида натрия и пептона pH 7,0

РЕКОМЕНДУЕМЫЕ РАСТВОРЫ И ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ

Нижеописанные растворы и питательные среды удовлетворяют целям, для которых они предназначены в фармакопейном испытании на микробную контаминацию. Могут быть использованы и другие среды, при условии, что они имеют аналогичные питательные и селективные свойства в отношении тестируемых микроорганизмов.

Буферизированный раствор хлорида натрия и пептона pH 7,0

Калия дигидрофосфат	3,6 г
Натрия гидрофосфата дигидрат, эквивалент фосфата 0,067 М	7,2 г
Натрия хлорид	4,3 г
Пептон (мясной или казеиновый)	1,0 г
Вода очищенная	1000 мл

К этому раствору могут быть добавлены поверхностно-активные компоненты и инактиваторы антибактериальных агентов, например, полисорбат 80 в количестве от 1 г/л до 10 г/л. Стерилизуют в паровом стерилизаторе при 121^{0}С в течение 15 минут.

Питательный бульон А (бульон на основе гидролизатов казеина и соевых бобов)

Панкреатический гидролизат казеина	17,0 г
Папаиновый гидролизат соевых бобов	3,0 г
Натрия хлорид	5,0 г
Калия гидрофосфат	2,5 г
Глюкозы моногидрат	2,5 г
Вода очищенная	1000 мл

Значение pH доводят таким образом, чтобы после стерилизации оно составляло 7,3±0,2. Стерилизуют в паровом стерилизаторе при 121^{0}С в течение 15 минут.

Агаризованная среда В (агаризованная среда на основе гидролизатов казеина и соевых бобов)

Панкреатический гидролизат казеина	15,0 г
Папаиновый гидролизат соевых бобов	5,0 г
Натрия хлорид	5,0 г
Агар	15,0 г
Вода очищенная	1000 мл

Значение pH доводят таким образом, чтобы после стерилизации оно составляло 7,3±0,2. Стерилизуют в паровом стерилизаторе при 121^{0}С в течение 15 минут.

Агаризованная среда С (декстрозный агар Сабуро с антибиотиками)

Пептоны (мясной и казеиновый)	10,0 г
Глюкозы моногидрат	40,0 г
Агар	15,0 г
Вода очищенная	1000 мл

Значение pH доводят таким образом, чтобы после стерилизации оно составляло 5,6±0,2. Стерилизуют в паровом стерилизаторе при 121^{0}С в течение 15 минут. Непосредственно перед применением на литр среды добавляют 0,10 г бензилпенициллина натриевой соли и 0.10 г тетрациклина в виде стерильных растворов или добавляют 50 мг хлорамфеникола на 1 литр среды перед стерилизацией.

Питательный бульон D (лактозный бульон)

Говяжий экстракт	3,0 г
Панкреатический гидролизат желатина	5,0 г
Лактозы моногидрат	5,0 г
Вода очищенная	1000 мл

Значение pH доводят таким образом, чтобы после стерилизации оно составляло 6,9±0,2. Стерилизуют в паровом стерилизаторе при 121^{0}С в течение 15 минут и немедленно охлаждают.

Обогатительный питательный бульон Е (обогатительный бульон Моссела для энтеробактерий)

Панкреатический гидролизат желатина	10,0 г
Глюкозы моногидрат	5,0 г
Дегидратированная бычья желчь	20,0 г
Калия дигидрофосфат	3,0 г
Натрия гидрофосфата дигидрат	8,0 г
Бриллиантовый зеленый	15 мг
Вода очищенная	1000 мл

Значение pH доводят таким образом, чтобы после нагрева оно составляло 7,2±0,2. Нагревают при 100^{0}С в течение 30 минут и немедленно охлаждают.

Агаризованная среда F (агаризованная среда с глюкозой, кристаллическим фиолетовым, нейтральным красным и желчью)

Дрожжевой экстракт	3,0 г
Панкреатический гидролизат желатина	7,0 г
Соли желчных кислот	1,5 г
Лактозы моногидрат	10,0 г
Натрия хлорид	5,0 г

Глюкозы моногидрат	10,0 г
Агар	15,0 г
Нейтральный красный	30 мг
Кристаллический фиолетовый	2 мг
Вода очищенная	1000 мл

Значение pH доводят таким образом, чтобы после нагрева оно составляло 7,4±0,2. Нагревают до кипения: не нагревают в автоклаве.

Питательный бульон G (бульон Макконки)

Панкреатический гидролизат желатина	20,0 г
Лактозы моногидрат	10,0 г
Дегидратированная бычья желчь	5,0 г
Бромкрезоловый пурпурный	10 мг
Вода очищенная	1000 мл

Значение pH доводят таким образом, чтобы после стерилизации оно составляло 7,3±0,2. Стерилизуют в паровом стерилизаторе при 121^0C в течение 15 минут.

Агаризованная среда H (агар Макконки)

Панкреатический гидролизат желатина	17,0 г
Пептоны (мясной и казеиновый)	3,0 г
Лактозы моногидрат	10,0 г
Натрия хлорид	5,0 г
Соли желчных кислот	1,5 г
Агар	13,5 г
Нейтральный красный	30,0 мг
Кристаллический фиолетовый	1 мг
Вода очищенная	1000 мл

Значение pH доводят таким образом, чтобы после стерилизации оно составляло 7,1±0,2. Кипятят в течение одной минуты при постоянном встряхивании, затем стерилизуют в паровом стерилизаторе при 121^0C в течение 15 минут.

Питательный бульон I (бульон на основе тетратионата, желчи и бриллиантового зеленого)

Пептон	8,6 г
Бычья желчь, высушенная	8,0 г
Натрия хлорид	6,4 г
Кальция карбонат	20,0 г
Калия тетратионат	20,0 г
Бриллиантовый зеленый	70 мг
Вода очищенная	1000 мл

Значение pH доводят таким образом, чтобы после нагрева оно составляло 7,0±0,2. Нагревают только до кипения. Повторное нагревание не допускается

Агаризованная среда J (агар на основе дезоксихолата и цитрата)

Говяжий экстракт	10,0 г
Мясной пептон	10,0 г
Лактозы моногидрат	10,0 г
Натрия цитрат	20,0 г
Железа (III) цитрат	1,0 г
Натрия дезоксихолат	5,0 г

Агар	13,5 г
Нейтральный красный	20 мг
Вода очищенная	1000 мл

Значение pH доводят таким образом, чтобы после нагрева оно составляло 7,3±0,2. Осторожно нагревают до кипения и кипятят 1 минуту, охлаждают до 50^{0}C и разливают по чашкам Петри. Не автоклавируют.

Агаризованная среда K (агар на основе ксилозы, лизина, дезоксихолата)

Ксилоза	3,5 г
L-Лизин	5,0 г
Лактозы моногидрат	7,5 г
Сахароза	7,5 г
Натрия хлорид	5,0 г
Дрожжевой экстракт	3,0 г
Феноловый красный	80 мг
Агар	13,5 г
Натрия дезоксихолат	2,5 г
Натрия тиосульфат	6,8 г
Железа(III)-аммония цитрат	0,8 г
Вода очищенная	1000 мл

Значение pH доводят таким образом, чтобы после нагрева оно составляло 7,4±0,2. Нагревают только до кипения, охлаждают до 50^{0}C и разливают по чашкам Петри. Не автоклавируют.

Агаризованная среда L (агар на основе бриллиантового зеленого, фенолового красного, лактозы и сахарозы)

Пептоны (мясной или казеиновый)	10,0 г
Дрожжевой экстракт	3,0 г
Натрия хлорид	5,0 г
Лактозы моногидрат	10,0 г
Сахароза	10,0 г
Агар	20,0 г
Феноловый красный	80 мг
Бриллиантовый зеленый	12,5 мг
Вода очищенная	1000 мл

Нагревают до кипения и кипятят 1 минуту. Значение pH доводят таким образом, чтобы после стерилизации оно составляло 6,9±0,2. Непосредственно перед использованием стерилизуют в паровом стерилизаторе при 121^{0}C в течение 15 минут, охлаждают до 50^{0}C и разливают по чашкам Петри.

Агаризованная среда M (тройной агар на основе сахара и железа)

Говяжий экстракт	3,0 г
Дрожжевой экстракт	3,0 г
Пептоны (казеиновый или говяжий)	20,0 г
Натрия хлорид	5,0 г
Лактозы моногидрат	10,0 г
Сахароза	10,0 г
Глюкозы моногидрат	1,0 г
Железа(III)-аммония цитрат	0,3 г
Натрия тиосульфат	0,3 г
Феноловый красный	25 мг

Агар	12,0 г
Вода очищенная	1000 мл

Нагревают до кипения и кипятят 1 минуту, встряхивая. Значение pH доводят таким образом, чтобы после стерилизации оно составляло 7,4±0,2. Разливают по пробиркам на третью часть их высоты, стерилизуют в паровом стерилизаторе при 121^{0}С в течение 15 минут и оставляют до охлаждения в положении, обеспечивающем получение образца в форме столбика и скошенной поверхности.

Агаризованная среда N (агар на основе цетримида)

Панкреатический гидролизат желатина	20,0 г
Магния хлорид	1,4 г
Калия сульфат	10,0 г
Цетримид	0,3 г
Агар	13,6 г
Вода очищенная	1000 мл
Глицерин	10,0 мл

Нагревают до кипения и кипятят 1 минуту, встряхивая. Значение pH доводят таким образом, чтобы после стерилизации оно составляло 7,2±0,2. Стерилизуют в паровом стерилизаторе при 121^{0}С в течение 15 минут.

Агаризованная среда O (агар Байерд-Паркера)

Панкреатический гидролизат казеина	10,0 г
Говяжий экстракт	5,0 г
Дрожжевой экстракт	1,0 г
Лития хлорид	5,0 г
Агар	20,0 г
Глицин	12,0 г
Натрия пируват	10,0 г
Вода очищенная	950 мл

Нагревают до кипения и кипятят 1 минуту, встряхивая. Значение pH доводят таким образом, чтобы после стерилизации оно составляло 6,8±0,2. Стерилизуют в паровом стерилизаторе при 121^{0}С в течение 15 минут, охлаждают до 45-50^{0}С и добавляют 10 мл стерильного раствора теллурита калия с концентрацией 10 г/л и 50 мл эмульсии яичного желтка.

Питательная среда P (обогащенная среда для клостридий)

Говяжий экстракт	10,0 г
Пептон	10,0 г
Дрожжевой экстракт	3,0 г
Растворимый крахмал	1,0 г
Глюкозы моногидрат	5,0 г
Цистеина гидрохлорид	0,5 г
Натрия хлорид	5,0 г
Натрия ацетат	3,0 г
Агар	0,5 г
Вода очищенная	1000 мл

Агар замачивают, растворяют путем нагревания до кипения при постоянном перемешивании. При необходимости, значение pH доводят таким образом, чтобы после стерилизации оно составляло около 6,8. Стерилизуют в паровом стерилизаторе при 121^{0}С в течение 15 минут.

Питательная среда Q (колумбийский агар)

Панкреатический гидролизат казеина	10,0 г
Пепсиновый гидролизат мяса	5,0 г
Панкреатический гидролизат сердца	3,0 г
Дрожжевой экстракт	5,0 г
Маисовый крахмал	1,0 г
Натрия хлорид	5,0 г
Агар, в зависимости от гелеобразующей способности	10,0 – 15,0 г
Вода очищенная	1000 мл

Агар замачивают, растворяют путем нагревания до кипения при постоянном перемешивании. При необходимости, значение pH доводят таким образом, чтобы после стерилизации оно составляло 7,3±0,2. Стерилизуют в паровом стерилизаторе при 121^{0}С в течение 15 минут. Охлаждают до 45-50^{0}С, добавляют, при необходимости, гентамицина сульфат в количестве, соответствующем 20 мг основания гентамицина, и разливают по чашкам Петри.

Питательная среда R (среда на основе лактозы и сульфита)

Панкреатический гидролизат казеина	5,0 г
Дрожжевой экстракт	2,5 г
Натрия хлорид	2,5 г
Лактозы моногидрат	10,0 г
Цистеина гидрохлорид	0,3 г
Вода очищенная	1000 мл

Растворяют, доводят до pH 7,1±0,1 и разливают по 8 мл в пробирки размером 16 мм x 160 мм, содержащие маленькие трубки Дюрама. Стерилизуют в паровом стерилизаторе при 121^{0}С в течение 15 минут и хранят при 4^{0}С.

Перед использованием питательную среду нагревают в течение 5 минут на водяной бане и охлаждают. В каждую пробирку добавляют по 0,5 мл раствора натрия метабисульфита R концентрацией 12 г/л и 0,5 мл раствора железа(III)-аммония цитрата концентрацией 10 г/л. Оба раствора должны быть свежеприготовленными и профильтрованы через мембраны (размер пор 0,45 мкм).

Агаризованная среда S (R2A)

Дрожжевой экстракт	0,5 г
Протеозопептон	0,5 г
Гидролизат казеина	0,5 г
Глюкоза	0,5 г
Крахмал	0,5 г
Калия гидрофосфат	0,3 г
Магния сульфат, безводный	0,024 г
Натрия пируват	0,3 г
Агар	15,0 г
Вода очищенная	1000 мл

Значение pH доводят таким образом, чтобы после стерилизации оно составляло 7,2±0,2. Стерилизуют в паровом стерилизаторе при 121^{0}С в течение 15 минут.

Фосфатный буферный раствор с натрия хлоридом и пептоном (1/15 моль)

Калия фосфат однозамещенный	3,56 г
Натрия фосфат двузамещенный	7,23 г

Натрия хлорид	4,3 г
Пептон ферментативный сухой	1,0 г
Вода очищенная	до 1000 мл
pH	7,0

Компоненты растворяют в очищенной воде при нагревании, фильтруют через бумажный фильтр.

Стерилизуют в паровом стерилизаторе при температуре 121^{0}С в течение 15 минут.

Среда № 1 – для выращивания бактерий

Пептон ферментативный сухой	10,0 г
Натрия хлорид	5,0 г
Глюкоза	1,0 г
Агар	13,0 г
Мясная вода	1000 мл

Все компоненты растворяют в мясной воде при нагревании, вносят глюкозу, значение pH доводят таким образом, чтобы после стерилизации оно составляло 7,3 ± 0,2. Кипятят 1 минуту, прибавляют агар, нагревают до полного его расплавления, фильтруют через ватно-марлевый фильтр.

Стерилизуют в паровом стерилизаторе при температуре 121 ^{0}С в течение 15 минут.

Жидкая среда №1 (мясо-пептонный бульон)

Пептон ферментативный сухой	10,0 г
Натрия хлорид	5,0 г
Глюкоза	1,0 г
Мясная вода	1000 мл

К мясной воде добавляют пептон и натрия хлорид, растворяют при нагревании, вносят глюкозу, значение pH доводят таким образом, чтобы после стерилизации оно составляло 7,3 ± 0,2. Кипятят 1 мин. Фильтруют через бумажный фильтр. Стерилизуют в паровом стерилизаторе при температуре 121 ^{0}С в течение 15 минут.

Среда № 2 – для выращивания грибов (Сабуро-агар)

Пептон ферментативный сухой	10,0 г
Глюкоза	40,0 г
Агар	13,0 г
Вода очищенная	1000 мл

Все компоненты растворяют в воде при нагревании, значение pH доводят таким образом, чтобы после стерилизации оно составляло 5,6 ± 0,2. Прибавляют агар, нагревают до полного его расплавления, фильтруют через ватно-марлевый фильтр. Для подавления роста бактерий после стерилизации прибавляют 100 мг бензилпенициллина и 100 мг тетрациклина (либо перед стерилизацией – 50 мг левомицетина) на 100 мл среды.

Стерилизуют в паровом стерилизаторе при температуре 121 ^{0}С в течение 15 минут.

Среда № 3 – для обогащении для бактерий семейства Enterobacteriaceae

Пептон ферментативный сухой	10,0 г

Калия фосфат однозамещенный	2,5 г
Натрия фосфат двузамещенный	7,5 г
Глюкоза	10,0 г
Феноловый красный	0,08 г
Малахитовый зеленый	0,015 г
Мясная вода	1000 мл

Пептон и соли растворяют в мясной воде при нагревании, вносят глюкозу, прибавляют 8 мл 1 % раствора фенолового красного и 3 мл 0,5 % раствора малахитового зеленого, значение рН доводят таким образом, чтобы после стерилизации оно составляло 7,3 ± 0,2. Кипятят 1 минуту, фильтруют через бумажный фильтр.

Стерилизуют в паровом стерилизаторе при температуре 121^{0}С в течение 15 минут.

Среда № 4 (агар Эндо) – для выделения бактерий семейства Enterobacteriaceae.

Панкреатический гидролизат рыбной муки	12,0 г
Экстракт пекарных дрожжей	1,0 г
Натрий хлористый	3,4 г
Натрия сульфит безводный	0,8 г
Натрия фосфат двузамещенный	0,5 г
D - лактоза	10,0 г
Фуксин основной	0,2 г
Агар	15,0 г
Вода очищенная	1000 мл

Ингредиенты размешивают в воде, значение рН доводят таким образом, чтобы после стерилизации оно составляло 7,4 ± 0,2. Нагревают до полного расплавления агара и кипятят 2-3 мин. Фильтруют через ватно-марлевый фильтр, снова нагревают до момента закипания. Охлаждают до температуры от 45^{0}С до 50^{0}С и разливают в чашки Петри.

Среда № 5 (висмутсульфит агар) – для выделения бактерий семейства Enterobacteriaceae

Панкреатический гидролизат мяса	10,1 г
Натрия фосфат двузамещенный	3,68 г
Натрия хлорид	2,6 г
Натрия карбонат	0,65 г
Висмута цитрат	2,38 г
Железа(II) аммония сульфат	0,97 г
D-глюкоза	3,9 г
Агар	15,0
Бриллиантовый зеленый	0,028
Вода очищенная	1000 мл

Ингредиенты размешивают в воде, значение рН доводят таким образом, чтобы после стерилизации оно составляло 7,6 ± 0,2. Нагревают до полного расплавления агара и кипятят 3-5 минут. Охлаждают до температуры от 45^{0}С до 50^{0}С и разливают в чашки Петри.

Среда № 6 – для определения ферментации глюкозы:

Пептон ферментативный сухой	10,0 г
Натрия хлорид	5,0 г

Глюкоза	40,0 г
Феноловый красный	0,08 г
Мясная вода	1000 мл

Пептон и натрия хлорид растворяют в мясной воде при нагревании, вносят глюкозу, прибавляют 8 мл 1 % раствора фенолового красного, значение pH доводят таким образом, чтобы после стерилизации оно составляло 7,2 ± 0,2. Кипятят 1 минуту, фильтруют через бумажный фильтр и разливают в пробирки с поплавками по 4 - 5 мл. Стерилизуют в паровом стерилизаторе при температуре 121°С в течение 15 минут. По окончании стерилизации быстро охлаждают.

Среда № 7 – для определения восстановления нитратов в нитриты:

Пептон ферментативный сухой	5,0 г
Натрия хлорид	5,0 г
Калия нитрат	1,5 г
Вода очищенная	1000 мл

Все компоненты растворяют в воде при нагревании, значение pH доводят таким образом, чтобы после стерилизации оно составляло 7,2 ± 0,2. Кипятят 1 минуту, фильтруют через бумажный фильтр, разливают в пробирки по 4 - 5 мл. Стерилизуют в паровом стерилизаторе при температуре 121°С в течение 15 минут.

Среда № 8 - среда обогащения для Pseudomonas aeruginosa и Staphylococcus aureus

Пептон ферментативный сухой	10,0 г
Натрия хлорид	5,0 г
Калия фосфат двузамещенный	2,5 г
Глюкоза	2,5 г
Вода очищенная	до 1000 мл

Пептон и соли растворяют в воде при нагревании, вносят глюкозу, значение pH доводят таким образом, чтобы после стерилизации оно составляло 7,3 ± 0,2. Кипятят 1 минуту, фильтруют через бумажный фильтр.

Стерилизуют в паровом стерилизаторе при температуре 121°С в течение 15 минут.

Среда № 9 – для выявления пигмента пиоцианина

Пептон ферментативный сухой	20,0 г
Магния хлорид безводный	1,4 г
Калия сульфат безводный	10,0 г
Глицерин	10,0 мл
Агар	15,0 г
Вода очищенная	1000 мл

Пептон и соли растворяют в воде. Затем вносят глицерин, растворяют при нагревании, значение pH доводят таким образом, чтобы после стерилизации оно составляло 7,2 ± 0,2. Кипятят 1 минуту, прибавляют агар, нагревают до полного его расплавления, фильтруют через ватно-марлевый фильтр.

Стерилизуют в паровом стерилизаторе при температуре 121°С в течение 15 минут.

Среда № 10 – для идентификации Staphylococcus aureus

Пептон ферментативный сухой	10,0 г
Натрия хлорид	75,0 г
Маннит	10,0 г
Феноловый красный	0,025 г
Агар	15,0 г
Вода очищенная	1000 мл

Все ингредиенты растворяют в воде, прибавляют 2,5 мл 1 % раствора фенолового красного, значение рН доводят таким образом, чтобы после стерилизации оно составляло 7,4 ± 0,2. Кипятят 1 минуту, прибавляют агар, нагревают до полного его расплавления, фильтруют через ватно-марлевый фильтр.

Стерилизуют в паровом стерилизаторе при температуре 121^{0}С в течение 15 минут.

Среда № 11 – для предварительного обогащения энтеробактерий

Пептон ферментативный сухой	8,0 г
Лактоза	5,0 г
Вода очищенная	1000 мл

Все компоненты растворяют в воде при нагревании, значение рН доводят таким образом, чтобы после стерилизации оно составляло 6,9 ± 0,1. Фильтруют через бумажный фильтр.

Стерилизуют в паровом стерилизаторе при температуре 121^{0}С в течение 15 минут.

Среда № 12 (селенитовая среда) – для накопления и выделения бактерий рода Salmonella

Панкреатический гидролизат казеина	5,26 г
Лактоза	4,21 г
Динатрия фосфат	6,32
Натрий селенистокислый кислый (без теллура)	4,21 г
Вода очищенная	1000 мл

Препарат гигроскопичен и светочувствителен.

Указанное в прописи количество тщательно размешивают в 1000 мл воды. Колбу закрывают ватной пробкой, быстро доводят до кипения (до образования пузырьков) и сразу прекращают нагрев. рН после стерилизации - 7,5 ± 0,2.

Среда № 13 (трехсахарный агар с солями железа)

Мясной экстракт	3,0 г
Дрожжевой экстракт	3,0 г
Пептон	20,0 г
Лактоза	10,0 г
Сахароза	10,0 г
Глюкоза	1,0 г
Железа сульфат	0,2 г
Натрия хлорид	5,0 г

Натрия тиосульфат (серноватистокислый)	0,3 г
Феноловый красный	0,024 г
Агар	15,0 г
Вода очищенная	1000 мл

Ингредиенты растворяют в воде при нагревании, значение pH доводят таким образом, чтобы после стерилизации оно составляло 7,3 ± 0,2. Фильтруют через ватно-марлевый фильтр.

Среду разливают в пробирки по 7 мл.

Стерилизуют в паровом стерилизаторе при температуре 121^{0}С в течение 15 минут.

При охлаждении скашивают, оставляя столбик 2,5 - 3,0 см.

Среда № 14 (цитратный агар Симмонса)

Натрия хлорид	5,0 г
Магния сульфат	0,2 г
Аммония дигидрофосфат	1,0 г
Калия гидрофосфат	1,0 г
Натрия цитрат	3,0 мл
Бромтимоловый синий	0,08 г
Агар	20,0 г
Вода очищенная	1000 мл

Соли растворяют в воде, вносят агар и нагревают до полного его расплавления, значение pH доводят таким образом, чтобы после стерилизации оно составляло 7,2 ± 0,1. Фильтруют через ватно-марлевый фильтр, добавляют 40 мл 0,2 % водного раствора бромтимолового синего.

Среду разливают в пробирку по 5-7 мл.

Стерилизуют в паровом стерилизаторе при температуре 121^{0}С в течение 15 минут.

При охлаждении скашивают, оставляя столбик 2,0 - 2,5 см.

Среда № 15 (бульон Хоттингера) – для определения индола

Раствор гидролизата мяса по Хоттингеру с содержанием аминного азота 120-140 мг %	1000 мл
Натрия хлорид	5,0 г
Калия фосфат двузамещенный	1,0 г
или калия фосфат двузамещенный 3-водный	1,31 г

Гидролизат Хоттингера разводят водой до содержания в среде 120-140 мг% аминного азота, добавляют соли, значение pH доводят таким образом, чтобы после стерилизации оно составляло 7,5 ± 0,1. Кипятят 15 минут, фильтруют через бумажный фильтр.

Стерилизуют в паровом стерилизаторе при температуре 121^{0}С в течение 15 минут.

0,9 % раствор натрия хлорида

Натрия хлорид	9 г
Вода очищенная	до 1000 мл

Навеску NaCl помещают в мерную колбу на 1000 мл и доводят объем раствора до метки очищенной водой. Раствор фильтруют через бумажный фильтр.

Стерилизуют в паровом стерилизаторе при температуре 121^0С в течение 15 минут.

Раствор № 1 для промывания мембраны

Пептон ферментативный	1,0 г
Вода очищенная	до 1000 мл
pH после стерилизации	7,1 ± 0,2

Раствор № 2 для промывания мембраны

Пептон ферментативный	5,0 г
Твин-80	10,0 г
Вода очищенная	до 1000 мл
pH после стерилизации	7,1 ± 0,2

Растворы № 1 и № 2 стерилизуют в паровом стерилизаторе при температуре 121^0С в течение 15 минут.

1 % раствор фенолового красного

Феноловый красный	1,0 г
Раствор едкого натра 0,1 моль/л	28,2 мл
Вода очищенная	до 100 мл

Навеску индикатора растирают в ступке, прибавляя небольшими порциями едкий натр. Полученный раствор переносят в мерную колбу вместимость 100 мл и доводят объем раствора до метки очищенной водой. Хранят во флаконе нейтрального светозащитного стекла при температуре от 4^0С до 10^0С.

0,5 % раствор малахитового зеленого

Малахитовый зеленый	0,5 г
Вода очищенная	до 100 мл

Навеску красителя помещают в мерную колбу на 100 мл, доводят объем раствора до метки стерильной горячей водой. Раствор выдерживают сутки в термостате, периодически перемешивая.

Реактив Грисса

Раствор № 1: 0,5 г сульфаниловой кислоты растворяют в 30 мл ледяной уксусной кислоты, прибавляют 100 мл воды, фильтруют.

Раствор № 2: 0,1 г 1-нафтиламина растворяют в 100 мл кипящей воды, охлаждают, прибавляют 30 мл ледяной уксусной кислоты, фильтруют.

Перед употреблением смешивают равные объемы растворов № 1 и № 2.

Реактив на цитохромоксидазу

Раствор № 1: 1 % спиртовой раствор 1-нафтола.

Раствор № 2: 1 % раствор N, N-диметил-р-фенилендиамина дигидрохлорида.

Перед употреблением смешивают раствор **№ 1 и № 2** в соотношении 2:3.

Реактив Ковача

Спирт амиловый или изоамиловый	75 г
n-диметиаминобензальдегид	5,0 г
Кислота хлористоводородная концентрированная	20 мл

Навеску альдегида растворяют в спирте при легком нагревании (на водяной бане при 50-55 ^{0}С), охлаждают и медленно добавляют кислоту.

Раствор должен быть желтого цвета.

Реактив Эрлиха

Спирт этиловый 96 %	95 мл
n-диметиаминобензальдегид	1,0 г
Кислота хлористоводородная концентрированная	20 мл

Навеску альдегида растворяют в спирте и медленно добавляют кислоту.

2.6.14. БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ЭНДОТОКСИНЫ

Испытание на бактериальные эндотоксины проводят для определения наличия или количества эндотоксинов, источником которых являются грамотрицательные бактерии, с использованием лизата амебоцитов мечехвоста *Limulus polyphemus* или *Tachypleus tridentatus.* Существует три принципа проведения данного испытания: принцип гель-тромба, основанный на образовании геля; турбидиметрический принцип, основанный на помутнении в результате расщепления эндогенного субстрата; хромогенный принцип, основанный на появлении окраски после расщепления синтетического пептидно-хромогенного комплекса.

В настоящем разделе описаны шесть методов:

Метод А. Гель-тромб-метод: предельное испытание.

Метод В. Гель-тромб-метод: полуколичественное испытание.

Метод С. Турбидиметрический кинетический метод.

Метод D. Хромогенный кинетический метод.

Метод Е. Хромогенный метод конечной точки.

Метод F. Турбидиметрический метод конечной точки.

Испытание выполняют любым из этих шести методов. В сомнительных и спорных случаях окончательное решение принимают, основываясь на методе А, если иное не предписано в частной статье.

Испытание выполняют в условиях, не допускающих загрязнения посторонними эндотоксинами.

Оборудование

Всю стеклянную посуду и другую термоустойчивую аппаратуру депирогенизируют в сухожаровом шкафу с использованием процесса с подтвержденной эффективностью. Общеприняты минимальные значения времени и температуры обработки, составляющие 30 минут и 250^{0}С, соответственно. При использовании пластиковой аппаратуры, например, микротитрационных планшетов и наконечников для автоматических пипеток, следует продемонстрировать отсутствие на ней поддающихся определению эндотоксинов и мешающих факторов.

Примечание: в данном разделе термин «пробирка» включает в себя все типы сосудов, например, микротитрационные планшеты.

Приготовление исходного стандартного раствора эндотоксина

Исходный стандартный раствор эндотоксина готовят из стандартного образца эндотоксина, калиброванного по отношению к международному стандарту, например из Стандартного образца *эндотоксина BRP*.

Количественное содержание эндотоксина выражают в Международных Единицах (МЕ). Эквивалентность международного стандарта в международных единицах устанавливается Всемирной организацией здравоохранения.

Примечание: Одна международная единица (МЕ) эндотоксина эквивалентна одной единице эндотоксина (ЕЭ).

Исходный стандартный раствор эндотоксина готовят и хранят, следуя спецификациям, приведенным на листке-вкладыше и этикетке.

Приготовление стандартных растворов эндотоксина

Необходимые последовательные разведения предварительно интенсивно перемешанного исходного стандартного раствора эндотоксина готовят с использованием воды для испытания на бактериальные эндотоксины (вода для ИБЭ). Эти растворы используют по возможности быстро, чтобы избежать потери активности вследствие адсорбции.

Приготовление испытуемых растворов

Испытуемые растворы готовят путем растворения или разбавления активных субстанций или медицинской продукции с использованием воды для ИБЭ. Для некоторых субстанций и препаратов более подходящим является растворение или разбавление с использованием других водных растворов. При необходимости, доводят значение pH испытуемого раствора (или его разведения) так, чтобы pH его смеси с лизатом находилось в интервале, предписанном производителем лизата. Обычно это относится к продукции со значением pH в интервале от 6,0 до 8,0. Значение pH может быть доведено с использованием кислоты, основания или подходящего буферного раствора, по рекомендациям производителя лизата. Кислоты и основания могут быть приготовлены из концентратов или порошков с использованием воды для ИБЭ в контейнерах, не содержащих определяемых количеств эндотоксина. Должно быть подтверждено отсутствие в буферных растворах отсутствие эндотоксинов и мешающих факторов.

Определение максимально допустимого разведения

Максимально допустимое разведение (МДР) - максимальное разведение образца, при котором может быть определено предельное содержание эндотоксина. МДР вычисляют по формуле:

$$МДР = \frac{Предельное\ содержание\ эндотоксинов \times Концентрация\ испытуемого\ раствора}{l},$$

Предельное содержание эндотоксинов: для активных субстанций, предназначенных для парентерального введения, равно:

$$\frac{K}{M},$$

где :

К - допустимая пирогенная доза эндотоксина, вводимая в течение часа на килограмм массы тела,

М - максимальная рекомендованная доза продукта, вводимая в течение часа на килограмм массы тела.

Предел эндотоксина для активных субстанций, предназначенных для парентерального введения, указывается в частных статьях и выражается в таких единицах, как МЕ/мл, МЕ/мг, МЕ/(единица биологической активности) и т.д.

Концентрация испытуемого раствора:

- в мг/мл, если предельное содержание эндотоксинов выражено в массовых единицах (МЕ/мг),

- в Ед/мл, если предельное содержание эндотоксинов выражено в пересчете на единицу биологической активности (МЕ/Ед)

- в мл/мл, если предельное содержание эндотоксинов выражено в объемных единицах (МЕ/мл).

λ - чувствительность лизата в гель-тромб-методе, указанная на этикетке, или низшая точка стандартной кривой в турбидиметрических или хромогенных методах.

ПРИНЦИП ГЕЛЬ-ТРОМБА (МЕТОДЫ А И В)

Гель-тромб-методы позволяют определять наличие и количество эндотоксинов и основываются на эффекте свертывания лизата в присутствии эндотоксинов. Концентрация эндотоксинов, требующаяся для свертывания лизата в стандартных условиях, представляет собой указанную на этикетке чувствительность лизата. Для обеспечения точности и достоверности испытания указанную чувствительность лизата следует подтвердить, а также провести испытание на мешающие факторы, описанное в подразделе «1. Предварительные испытания».

1. ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ ИСПЫТАНИЯ

(i) Подтверждение заявленной чувствительности лизата

Перед использованием лизата в испытаниях указанную на этикетке чувствительность λ, выраженную в МЕ/мл, следует подтвердить в четырех повторностях. Подтверждение чувствительности лизата выполняют при использовании новой партии лизата или при любом изменении экспериментальных условий, способном повлиять на результат испытания.

Готовят стандартные растворы не менее, чем четырех концентраций, эквивалентных 2λ, λ, 0,5λ и 0,25 λ, путем разбавления исходного стандартного раствора эндотоксина водой для ИБЭ.

В каждой из пробирок смешивают раствор лизата с равным объемом одного из стандартных растворов (например, по 0,1 мл каждого). Если используются одноразовые флаконы или ампулы с лиофилизированным лизатом, растворы добавляют непосредственно в ампулу или флакон. Реакционную смесь инкубируют в течение определенного периода, в соответствии с рекомендациями производителя лизата (обычно 37±1^{0}С в течение 60±2 минут), избегая вибрации. Исследуют целостность геля: при использовании пробирок каждую из них по очереди извлекают из инкубатора и переворачивают одним плавным движением приблизительно на 180^0. Если образуется твердый гель, остающийся на своем месте после пе-

реворачивании, результат записывают как положительный. Результат отрицательный, если неповрежденного геля не образуется.

Результаты испытания считают достоверными, если низшая концентрация стандартных растворов во всех повторностях дает отрицательный результат.

За конечную точку принимают последний положительный результат в нисходящем ряду концентраций эндотоксина. Вычисляют среднее значение логарифмов концентраций в конечных точках и, затем, антилогарифм этого среднего значения по следующей формуле:

Среднее геометрическое концентраций в конечных точках =

$$\text{antilog}\,[(\Sigma e)/f],$$

где:

Σe - сумма логарифмов концентраций в конечных точках в используемом ряду разведений,

f - число повторностей.

Среднее геометрическое концентраций в конечных точках представляет собой измеренную чувствительность раствора лизата (МЕ/мл). Если это значение составляет не менее 0,5λ и не более 2λ, чувствительность, указанную на этикетке, считают подтвержденной и используют в испытаниях, выполняемых с этим лизатом.

(ii) Определение мешающих факторов

Готовят растворы A, B, C и D в соответствии с Таблицей 2.6.14.-1 и используют не содержащий определяемых эндотоксинов испытуемый раствор в разведении, меньшем МДР в соответствии с указаниями подраздела «1. Предварительные испытания. (i) Подтверждение заявленной чувствительности лизата».

Таблица 2.6.14.-1

Раствор	Концентрация эндотоксина/ Раствор, к которому добавляют эндотоксин	Растворитель	Фактор разведения	Исходная концентрация эндотоксина	Число повторностей
A	0 / Испытуемый раствор	-	-	-	4
B	2λ / Испытуемый раствор	Испытуемый раствор	1 2 4 8	2λ 1λ 0,5λ 0,25λ	4 4 4 4
C	2λ / Вода для ИБЭ	Вода для ИБЭ	1 2 4 8	2λ 1λ 0,5λ 0,25λ	4 4 4 4
D	0 / Вода для ИБЭ	-	-	-	4
Раствор A – раствор испытуемого препарата, не содержащий эндотоксинов в оп-					

ределяемых концентрациях, Раствор В – тест на мешающие факторы, Раствор С – контроль чувствительности, указанной на этикетке, Раствор D – отрицательный контроль (вода для ИБЭ)

Среднее геометрическое концентраций в конечных точках для растворов В и С вычисляют по формуле, приведенной в подразделе «1. Предварительные испытания. (i) Подтверждение заявленной чувствительности лизата».

Испытание на мешающие факторы повторяют в случае любых изменений экспериментальных условий, которые могут повлиять на результат.

Результаты испытания считают достоверными, если растворы A и D во всех повторностях дают отрицательный результат, а результат, полученный для раствора С, подтверждает чувствительность лизата, указанную на этикетке.

Если чувствительность лизата, определенная для раствора В, не менее 0,5λ и не более 2λ, считают, что испытуемый раствор в условиях испытания не содержит мешающих факторов. В иных случаях раствор оказывает влияние на результат испытания.

Если испытуемый препарат оказывает влияние на результат испытания в разведениях менее МДР, испытание на мешающие факторы повторяют с использованием больших разведений, но не превышающих МДР. Использование более чувствительного лизата позволяет применять большие разведения испытуемого препарата, и это может содействовать исключению мешающих факторов.

Мешающие факторы могут быть удалены соответствующей обработкой, например, путем фильтрации, нейтрализации, диализа или теплового воздействия. Для того, чтобы установить, что выбранный метод эффективно исключает мешающие факторы, не удаляя эндотоксины, испытания повторяют с использованием образца испытуемого препарата, к которому был добавлен стандартный образец эндотоксина и проведена выбранная процедура удаления мешающих факторов.

2. ПРЕДЕЛЬНОЕ ИСПЫТАНИЕ (МЕТОД А)

(i) Методика

Готовят растворы А, В, С и D в соответствии с Таблицей 2.6.14.-2 и выполняют испытание для этих растворов в соответствии с указаниями подраздела «1. Предварительные испытания. (i) Подтверждение чувствительности лизата, указанной на этикетке».

Таблица 2.6.14.-2

Раствор	Концентрация эндотоксина/ Раствор, к которому добавляют эндотоксин	Число повторностей
A	0/Разбавленный испытуемый раствор	2
B	2λ/ Разбавленный испытуемый раствор	2
C	2λ/ Вода для ИБЭ	2
D	0/ Вода для ИБЭ	2

Растворы А и В (положительный контроль с препаратом) готовят в разведениях не выше МДР и обрабатывают в соответствии с указаниями подраздела «1. Предварительные испытания. (ii) Определение мешающих факторов». Растворы

B и C (положительные контроли) содержат стандарт эндотоксина в концентрации, соответствующей двукратной заявленной чувствительности. Раствор D (отрицательный контроль) представляет собой воду для ИБЭ.

(ii) Интерпретация

Результаты испытания считают достоверными, если положительные контрольные растворы B и C в обеих повторностях дают положительный результат, а раствор D – отрицательный результат.

Испытуемый препарат выдерживает испытание, если для раствора A в обеих повторностях получен отрицательный результат.

Если для раствора A в обеих повторностях получен положительный результат:

- если при этом испытуемый раствор разбавлен до МДР, он не выдерживает испытание,

- если степень разведения препарата менее МДР, испытание повторяют с использованием разведения, не превышающего МДР.

В случае, если для одной из повторностей раствора A получен положительный результат, а для другой – отрицательный, испытание повторяют. Испытуемый препарат выдерживает испытание, если в повторном эксперименте для раствора A в обеих повторностях получен отрицательный результат.

2. ПОЛУКОЛИЧЕСТВЕННОЕ ИСПЫТАНИЕ (МЕТОД B)

(i) Методика

С помощью данного испытания определяют количество бактериальных эндотоксинов путем титрования до конечной точки. Готовят растворы A, B, C и D в соответствии с Таблицей 2.6.14.-3 и выполняют испытание для этих растворов в соответствии с указаниями подраздела «1. Предварительные испытания. (i) Подтверждение заявленной чувствительности лизата».

Таблица 2.6.14.-3.

Раствор	Концентрация эндотоксина/ Раствор, к которому добавляют эндотоксин	Растворитель	Фактор разведения	Исходная концентрация эндотоксина	Число повторностей
A	0 / Испытуемый раствор	Вода для ИБЭ	1 2 4 8	- - - -	2 2 2 2
B	2λ / Испытуемый раствор		1	2λ	2
C	2λ / Вода для ИБЭ	Вода для ИБЭ	1 2 4 8	2λ 1λ 0,5λ 0,25λ	2 2 2 2
D	0 / Вода для ИБЭ	-	-	-	2

Раствор А – испытуемый раствор в разведении, не превышающем МДР, с которым проводилось определение мешающих факторов. Последующие разведения испытуемого раствора не должны превышать МДР. Используют воду для ИБЭ для получения двух рядов разведений в отношениях 1, 1/2, 1/4 и 1/8к разведению, с которым проводилось определение мешающих факторов. При необходимости могут быть использованы и другие разведения,

Раствор В – раствор А, содержащий стандарт эндотоксина в концентрации 2λ (положительный контроль с препаратом),

Раствор С – два ряда разведений воды для ИБЭ, содержащей стандарт эндотоксина в концентрациях 2λ, 1λ, 0,5λ, 0,25λ,

Раствор D – вода для ИБЭ (отрицательный контроль).

(ii) Вычисления и интерпретация

Результаты испытания считают достоверными при выполнении следующих трех условий:

(а) раствор D (отрицательный контроль) в обеих повторностях дает отрицательный результат,

(б) раствор В (положительный контроль с препаратом) в обеих повторностях дает положительный результат,

(с) среднее геометрическое концентраций в конечных точках для раствора С находится в пределах от 0,5λ до 2λ.

Для определения концентрации эндотоксинов в растворе А вычисляют концентрации в конечных точках для каждого ряда разбавлений в каждой из повторностей путем умножения фактора разбавления в конечной точке на λ.

За концентрацию эндотоксина в испытуемом растворе принимают среднее геометрическое концентраций в конечных точках в повторных экспериментах (см. формулу в подразделе «1. Предварительные испытания. (i) Подтверждение чувствительности лизата, указанной на этикетке»). Если испытание проводят с разбавленным испытуемым раствором, концентрацию эндотоксина в исходном растворе получают путем умножения на фактор разбавления.

Если ни одно из разведений испытуемого раствора в ходе испытания с подтвержденной достоверностью не дает положительного результата, концентрацию эндотоксинов регистрируют как «менее λ» (или, в случае использования разбавленного образца, как «менее (λ × наименьший фактор разведения образца)»). Если для всех разведений получен положительный результат, то концентрация эндотоксинов регистрируется как «равная или превышающая максимальный фактор разведения, умноженный на λ» (например, в Таблице 2.6.14.-3, это значение равно исходному фактору разведения × 8 × λ).

Препарат соответствует требованиям испытания, если концентрация эндотоксина менее указанной в частной статье.

ФОТОМЕТРИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ (МЕТОДЫ C, D, E и F)

1. ТУРБИДИМЕТРИЧЕСКИЙ ПРИНЦИП (МЕТОДЫ С и F)

Данный принцип представляет собой фотометрическое испытание, основанное на измерении увеличения степени мутности. В зависимости от используемого подхода, с использованием данного метода могут быть проведены турбидиметрическое

испытание методом конечной точки и кинетическое турбидиметрическое испытание.

Турбидиметрический метод конечной точки (метод F) основан на количественном соотношении между концентрацией эндотоксина и степенью мутности (выражающейся в пропускании или поглощении света) реакционной смеси в конце инкубационного периода.

Кинетическое турбидиметрическое испытание (метод C) заключается либо в измерении времени, требующегося для достижения заданного значения поглощения в реакционной смеси, либо в определении скорости увеличения степени мутности.

Испытание проводят при температуре инкубации, рекомендованной производителем лизата (обычно 37 ± 1^0).

2. ХРОМОГЕННЫЙ ПРИНЦИП (МЕТОДЫ D и E)

Данный принцип основан на измерении количества хромофора, высвобождаемого из соответствующего хромогенного пептида в результате реакции эндотоксинов с лизатом. В зависимости от используемого подхода, с использованием данного метода могут быть проведены хромогенное испытание методом конечной точки и кинетическое хромогенное испытание.

Хромогенный метод конечной точки (метод E) основан на количественном соотношении между концентрацией эндотоксина и количеством хромофора, высвобождаемого к концу инкубационного периода.

Кинетическое хромогенное испытание (метод D) заключается либо в измерении времени, требующегося для достижения заданного значения поглощения в реакционной смеси, либо в определении скорости появления окраски.

Испытание проводят при температуре инкубации, рекомендованной производителем лизата (обычно 37 ± 1^0).

3. ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ ИСПЫТАНИЯ

Предварительные испытания проводят для обеспечения точности и достоверности результатов турбидиметрических и хромогенных испытаний. В ходе предварительных испытаний подтверждают выполнение критериев стандартной кривой и отсутствие мешающего влияния испытуемого раствора на результаты испытания.

При внесении любых изменений в экспериментальные условия, которые могут повлиять на результаты, требуется подтверждение пригодности метода испытания.

(i) Подтверждение выполнения критериев стандартной кривой

Для получения стандартной кривой готовят не менее трех концентраций эндотоксина с использованием стандартного раствора эндотоксина. Проводят испытание с каждым стандартным раствором эндотоксина не менее трех раз в соответствии с рекомендациями производителя лизата (объемные отношения, время инкубации, температура, pH и т.д.).

Если при использовании кинетических методов желаемый интервал в логарифмической шкале превышает 2, в испытание должны быть включены дополни-

тельные стандарты для включения каждого увеличенного логарифмического значения в диапазон стандартной кривой.

В диапазоне концентраций эндотоксина, указанном производителем лизата, абсолютное значение коэффициента корреляции, $|r|$, должно превышать или быть равным 0,980.

(ii) Определение мешающих факторов

Выбирают концентрацию эндотоксина в центре или недалеко от центра стандартной кривой. Готовят растворы A, B, C и D в соответствии с Таблицей 2.6.14.-4. Проводят испытание с каждым из этих растворов не менее, чем в двух повторностях в соответствии с рекомендациями производителя лизата (объем испытуемого раствора и раствора лизата, объемное соотношение испытуемого раствора и раствора лизата, время инкубации и т.д.).

Таблица 2.6.14.-4

<table>
<tr><th>Раствор</th><th>Концентрация эндотоксина</th><th>Раствор, к которому добавляют эндотоксин</th><th>Число повторностей</th></tr>
<tr><td>A</td><td>Отсутствует</td><td>Испытуемый раствор</td><td>Не менее 2</td></tr>
<tr><td>B</td><td>Средняя концентрация стандартной кривой</td><td>Испытуемый раствор</td><td>Не менее 2</td></tr>
<tr><td>C</td><td>Не менее трех концентраций (низшая определяется λ)</td><td>Вода для ИБЭ</td><td>Не менее 2</td></tr>
<tr><td>D</td><td>Отсутствует</td><td>Вода для ИБЭ</td><td>Не менее 2</td></tr>
<tr><td colspan="4">Раствор A – испытуемый раствор, который может быть разбавлен без превышения МДР,

Раствор B – испытуемый препарат в разбавлении, аналогичном раствору A, содержащий добавленный эндотоксин в концентрации, соответствующей или близкой к центру стандартной кривой,

Раствор C – стандартный раствор эндотоксина в концентрациях, использовавшихся при валидации метода в соответствии с указаниями подраздела «3. Предварительные испытания. (i) Подтверждение выполнения критериев стандартной кривой» (положительные контроли),

Раствор D – вода для ИБЭ (отрицательный контроль)</td></tr>
</table>

Вычисляют среднее значение возврата эндотоксина вычитанием средней концентрации эндотоксина в растворе (при ее наличии) из средней концентрации эндотоксина в растворе, содержащем добавленный эндотоксин.

Считают, что испытуемый раствор не содержит мешающих факторов, если в условиях испытания вычисленная концентрация эндотоксина, добавленного к испытуемому раствору, находится в пределах 50–200% от известной концентрации добавленного эндотоксина, после вычитания концентрации эндотоксина, обнаруженной в растворе, не содержащем добавок стандарта.

Если возврат эндотоксина не попадает в указанные пределы, следует провести операцию исключения мешающих факторов в соответствии с указаниями, приведенными при описании принципа гелевого сгустка, подраздел «1. Предварительные испытания. (ii) Определение мешающих факторов». Эффективность об-

работки подтверждают повторным проведением испытания на мешающие факторы.

4. ИСПЫТАНИЕ

(i) Метод

Следуют указаниям, приведенным в подразделе «3. Предварительные испытания. (ii) Определение мешающих факторов».

(ii) Вычисления

Для раствора А в каждой повторности определяют концентрацию эндотоксина с использованием стандартной кривой, полученной из ряда положительных контролей, раствор С.

Результаты испытания считают достоверными при выполнении следующих трех условий:

(а) результат, полученный для раствора D (отрицательный контроль), не превышает предельное холостое значение, требуемое в описании используемого лизата,

(б) результаты, полученные для растворов С (положительные контроли) соответствуют требованиям валидации, приведенным в подразделе «1. Предварительные испытания. (i) Подтверждение выполнения критериев стандартной кривой»,

(с) возврат эндотоксина, вычисленный из концентрации эндотоксина, определенной в растворе В, после вычитания концентрации эндотоксина, определенной в растворе А, находится в пределах 50–200%.

(iii) Интерпретация

Испытуемый препарат соответствует требованиям испытания, если средняя концентрация эндотоксина в повторностях раствора А, с учетом разведений и концентрации, менее предельного значения эндотоксина для препарата.

5. РЕАГЕНТЫ

(i) Раствор лизата

Лизат амебоцитов растворяют путем осторожного перемешивания в воде для ИБЭ или в буфере, в соответствии с рекомендациями производителя лизата. Восстановленный лизат хранят в охлажденном или замороженном состоянии, в соответствии с указаниями производителя.

(ii) Лизат амебоцитов

Лизат амебоцитов – лиофилизированный продукт, полученный из амебоцитного лизата мечехвоста (*Limulus polyphemus* или *Tachypleus tridentatus*). Этот реагент может производиться только в соответствии с предписаниями компетентных органов.

Лизат амебоцитов, кроме эндотоксинов, может реагировать и с некоторыми β-гликанами. Имеются препараты лизата амебоцитов, не реагирующие с гликанами; они изготавливаются путем удаления из лизата амебоцитов G-фактора, реагирующего с гликанами, или ингибированием реакционной системы G-фактора в лизате амебоцитов. Эти препараты могут использоваться для определения эндотоксинов в присутствии гликанов.

(iii) Вода для ИБЭ (вода для испытания на бактериальные эндотоксины)

Вода для ИБЭ – *вода для инъекций R* или вода, подготовленная с использованием других методов, не дающая реакции с лизатом на пределе чувствительности реагента.

Следующая часть публикуется в информационных целях.

ИСПЫТАНИЕ НА БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ЭНДОТОКСИНЫ: РУКОВОДСТВО

1. ВВЕДЕНИЕ

Эндотоксины, источником которых являются грамотрицательные микроорганизмы, являются наиболее распространенной причиной токсических реакций, приписываемых наличию в фармацевтических препаратах пирогенных примесей; их пирогенная активность намного выше, чем у большинства других пирогенных субстанций. Эндотоксины представляют собой липополисахариды. Несмотря на то, что существует незначительное количество пирогенов другой структуры, обычно по отсутствию бактериальных эндотоксинов в продукте можно сделать вывод об отсутствии пирогенных компонентов при условии, что наличие пирогенных субстанций, не относящихся к эндотоксинам, можно исключить.

Присутствие эндотоксинов в продукте может маскироваться факторами, влияющими на протекание реакции эндотоксинов с лизатом амебоцитов. Поэтому аналитик, желающий заменить требуемое в фармакопейной статье испытание на пирогенность с использованием кроликов тестом на бактериальные эндотоксины, должен продемонстрировать, что этот тест может быть выполнен для данного продукта; при этом может оказаться необходимым выполнение процедуры удаления мешающих факторов.

Как указано в методике испытания на бактериальные эндотоксины, результаты испытания образца можно считать достоверными лишь при наличии следующей информации:

1.1. Должна быть установлена пригодность материала, используемого в испытании. Должно быть гарантировано отсутствие эндотоксинов в воде для ИБЭ и других реагентах, а чувствительность лизата амебоцитов должна быть проверена для подтверждения чувствительности, заявленной производителем.

1.2. В связи с тем, что испытуемый продукт может влиять на ход испытания, чувствительность лизата амебоцитов должна быть определена в присутствии и отсутствии испытуемого продукта. Между двумя значениями чувствительности не должно быть существенной разницы.

В испытании на бактериальные эндотоксины (*2.6.14*) указаны методы исключения мешающих факторов; в случае наличия мешающих факторов после применения этого метода должно быть проведено дополнительное испытание с целью проверки надежности удаления или нейтрализации мешающих факторов.

В данном разделе поясняются причины требований, предъявляемых в испытании на бактериальные эндотоксины, и даются указания, касающиеся регистрации и интерпретации результатов.

Замена требуемого по частной статье испытания на пирогенность с использованием кроликов на испытание с участием лизата амебоцитов фактически означает использование альтернативного метода анализа и, поэтому, требует вали-

дации; в подразделе 11 приведены некоторые указания, касающихся практических действий в данном направлении.

Ссылка на метод, который следует применять для данного продукта, содержится в соответствующих частных статьях; если метод не указан, применяют метод А. Если используется метод, отличный от предписанного, должно быть продемонстрировано, что применяемый метод является подходящим для данного продукта и дает результат, находящийся в согласии с результатом, получаемым предписанным методом (см. также подраздел 13).

2. МЕТОД

Несмотря на то, что добавление эндотоксинов к амебоцитному лизату в растворе может приводить к помутнению, осаждению или гелеобразованию, для определения конечной точки фармакопейного испытания первого типа использовали лишь образование гелевого сгустка. Преимуществом являлась простота принятия решения о том, выдерживает ли продукт испытание, которое обосновывается наличием или отсутствием гелеобразования, легко определяемыми невооруженным глазом. Количественные методы C, D, E и F были разработаны позже; они требуют более сложного оборудования, но легче поддаются автоматизации для регулярного контроля большого количества образцов одного и того же продукта.

Эндотоксины могут адсорбироваться на поверхности пробирок или пипеток, выполненных из некоторых видов пластика и типов стекла. Могут возникать помехи, обусловленные высвобождением веществ из пластических материалов. Поэтому используемые материалы следует подвергать проверке; последующие партии пробирок или пипеток могут иметь несколько отличающийся состав, и поэтому рекомендуется повторять такие испытания при начале работы с новой партией материала.

Решение об использовании испытания на бактериальные эндотоксины в качестве теста на предельное содержание подразумевает, во-первых, что для испытуемого продукта должна быть определена пороговая концентрация эндотоксина и, во-вторых, что требуется определить, выше или ниже этого порога концентрация эндотоксина в испытуемом продукте. Количественные методы C, D, E и F дают возможность определить концентрацию эндотоксина в образце, но для определения соответствия Фармакопее и при рутинном контроле качества, основной вопрос заключается в том, превышает ли эта концентрация установленный предел.

При установлении пороговой концентрации эндотоксина в испытуемом продукте следует уделять должное внимание человеческой дозе этого продукта: цель должна заключаться в том, чтобы гарантировать, что пока концентрация эндотоксина в продукте остается ниже такого порогового значения, даже максимальная доза, вводимая указанным путем в течение часа, не будет содержать эндотоксин в количестве, достаточном для возникновения токсической реакции.

Как в случае равенства концентрации эндотоксинов в продукте пороговому значению, так и в случае значительно больших концентраций, возникает гелеобразование, и продукт не выдерживает испытание, ввиду того, что характер испытания «все или ничего» делает невозможным различение концентрации, в точности равной пороговой, и более высокой. Вывод о том, что концентрация эндотоксина не превышает пороговое значение, можно сделать лишь при отсутствии гелеобразования.

Для продуктов, находящихся в твердом состоянии, такая пороговая концентрация эндотоксина на единицу массы или Международную Единицу продукта под-

лежит переводу в концентрацию эндотоксина в миллилитре испытуемого раствора, так как испытание может быть выполнено только с раствором. Случай, когда продукция уже пребывает в жидком виде (например, инфузионные жидкости), будет оговорен ниже.

Предельное содержание эндотоксинов: для активных субстанций, предназначенных для парентерального введения, определяется на основании дозы и равно:

$$\frac{K}{M},$$

где :

К - допустимая пирогенная доза эндотоксина, вводимая в течение часа на килограмм массы тела,

М - максимальная рекомендованная доза продукта, вводимая в течение часа на килограмм массы тела.

Предельное содержание эндотоксинов зависит от продукта и пути его введения и устанавливается в частных статьях. Предлагаемые значения *К* приведены в Таблице 2.6.14.-5.

Таблица 2.6.14.-5

Способ введения	**К, в МЕ эндотоксина на кг массы тела в час**
Внутривенно	5,0
Внутривенно, для радиофармацевтических препаратов	2,5
Интратекально	0,2

Какое разведение продукта должно быть использовано в испытании для получения максимальной уверенности в том, что отрицательный результат свидетельствует о том, что концентрация эндотоксина в продукте менее предельной, а положительный результат означает, что с помощью лизата обнаруживается концентрация, равная или превышающая предельную? Такое разведение зависит от установленного предела и от чувствительности лизата: для него применяется термин «максимально допустимое разведение» (МДР), и его значение может быть вычислено по следующей формуле:

$$МДР = \frac{Предельное\ содержание\ эндотоксинов \times Концентрация\ испытуемого\ раствора}{l},$$

Концентрация испытуемого раствора:

- в мг/мл, если предельное содержание эндотоксинов выражено в массовых единицах (МЕ/мг),

- в Ед/мл, если предельное содержание эндотоксинов выражено в пересчете на единицу биологической активности (МЕ/Ед)

- в мл/мл, если предельное содержание эндотоксинов выражено в объемных единицах (МЕ/мл).

λ - чувствительность лизата в гель-тромб-методе, указанная на этикетке, или низшая точка стандартной кривой в турбидиметрических или хромогенных методах.

В случаях, когда значение максимально допустимого разведения не является целочисленным, для рутинных целей может быть использовано подходящее целое число, меньшее МДР (что означает разведение раствора продукта в степени, меньшей, чем МДР). В таком случае, отрицательный результат свидетельствует о том, что концентрация эндотоксина в продукте ниже предельного значения. Однако, когда концентрация эндотоксина в продукте в таком испытании ниже предельного значения, но достаточно высока для того, чтобы реакция с лизатом привела к образованию сгустка, испытание в таких условиях может дать положительный результат. Поэтому, когда испытание с использованием такой «удобной» степени разведения дает положительный результат, продукт следует развести до МДР и повторить испытание. В любых сомнительных или спорных случаях следует использовать МДР.

Это подчеркивает важность подтверждения чувствительности лизата.

Пример

Следует провести испытание раствора фенитоина натриевой соли концентрацией 50 мг/мл, предназначенного для внутривенного введения. МДР определяют, используя следующие значения переменных:

M - максимальная человеческая доза = 15 мг на килограмм массы тела в час.

c = 50 мг/мл.

K = 5 МЕ эндотоксина на килограмм в час.

λ = 0,4 МЕ эндотоксина на миллилитр.

$$МДР = \frac{5 \times 50}{15} \times \frac{1}{0,4} = 41,67$$

Для рутинных испытаний этого продукта может быть целесообразно 1 мл испытуемого раствора разбавить до 20 мл (величина МДР/2, округленная до ближайшего меньшего целого числа). Однако, если испытание дает положительный результат, следует 1 мл разбавить до 41,67 мл и повторить испытание. Разведение до 41,67 необходимо также в тех случаях, когда испытание проводится для разрешения спорной ситуации.

3. СТАНДАРТНЫЙ МАТЕРИАЛ

Стандарт эндотоксина BRP используется в качестве препарата сравнения. Его количественное определение проводят в сравнении с Международным стандартом эндотоксина ВОЗ, и его активность выражается в МЕ эндотоксина в ампуле. Международная единица эндотоксина определяется как специфическая активность определенной массы Международного стандарта.

Для рутинных целей может быть использован другой препарат эндотоксина, при условии проведения его количественного определения в сравнении с Международным стандартом эндотоксина или BRP, и его активность выражена в МЕ эндотоксина.

Примечание: Одна международная единица (МЕ) эндотоксина эквивалентна одной единице эндотоксина (ЕЭ).

4. ВОДА ДЛЯ ИБЭ

Определение отсутствия эндотоксина в продукте путем проведения испытания на пирогенность на кроликах было исключено по практическим и теоретическим причинам:

4.1. Испытание на кроликах не обладает достаточной чувствительностью для определения эндотоксина в воде для ИБЭ, предназначенной для проведения испытаний продуктов с очень низкой предельной концентрацией эндотоксинов;

4.2. Относительно низкая точность температурной реакции у кроликов привела бы к необходимости проведения большого количества повторных испытаний;

4.3. Термины «пирогены» и «эндотоксины» относятся к группам веществ, которые не достаточно полно совпадают друг с другом.

В описании испытания на бактериальные эндотоксины указывается, что для приготовления воды для ИБЭ, кроме трехкратной дистилляции, могут быть использованы и другие методы. К хорошим результатам приводило использование метода обратного осмоса; некоторые аналитики могут предпочесть перегонять воду более трех раз. Какой бы метод ни использовался, полученный продукт не должен содержать поддающихся определению эндотоксинов.

5. pH СМЕСИ

Оптимальное гелеобразование смеси при проведении испытания на бактериальные эндотоксины достигается при значениях pH от 6,0 до 8,0. Однако, добавление лизата к образцу может привести к снижению pH.

6. ВАЛИДАЦИЯ ЛИЗАТА

При приготовлении растворов лизата важно следовать инструкциям производителя.

Факторы положительных конечных разведений в методах гелевого сгустка A и B переводят в логарифмы. Причина этого заключается в том, что если построить график частотного распределения этих логарифмических значений, то он обычно намного ближе к кривой нормального распределения, чем частотное распределение самих факторов разведения; фактически, они настолько близки, что допускается использование нормального частотного распределения в качестве математической модели и вычисление границ доверительного интервала с помощью t-критерия Стьюдента.

7. ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЕ ИСПЫТАНИЕ НА МЕШАЮЩИЕ ФАКТОРЫ

Некоторые продукты не могут быть подвергнуты испытанию на наличие эндотоксинов непосредственно, так как они не смешиваются с реактивами, не могут быть доведены до pH 6,0-8,0 или являются ингибиторами или активаторами гелеобразования. Поэтому требуется проведение предварительного испытания для проверки наличия мешающих факторов; в случае их обнаружения должно быть продемонстрировано что, процедура их удаления была эффективной.

Цель предварительного испытания состоит в проверке нулевой гипотезы о том, что чувствительность лизата в присутствии продукта существенно не отличается от чувствительности лизата в его отсутствии. В методах A и B используется простой критерий: нулевая гипотеза принимается, если чувствительность лизата в присутствии продукта составляет не менее 50% и не более 200% чувствительности самого лизата.

В соответствии с классическим подходом, следует вычислить среднее значение логарифма коэффициента разведения для чувствительности в присутствии и отсутствии продукта и оценить разницу между двумя средними значениями с помощью t-критерия Стьюдента.

Испытание на мешающие факторы в методах гелевого сгустка A и B требует использования образца продукта, в котором отсутствуют эндотоксины в поддаю-

щейся определению концентрации. Это представляет теоретическую проблему при испытании абсолютно новых продуктов. Поэтому для количественных методов C, D, E и F был разработан другой подход.

8. ИСКЛЮЧЕНИЕ МЕШАЮЩИХ ФАКТОРОВ

Методика удаления мешающих факторов не должна приводить к уменьшению или увеличению количества эндотоксинов в испытуемом продукте (например, вследствие адсорбции). Корректный способ проверки этого состоит в применении методики к обогащенному образцу продукта, т.е. к образцу, к которому было добавлено известное количество эндотоксина, с дальнейшим измерением его возврата.

Методы C и D. Если помехи обусловлены природой анализируемого продукта и не могут быть исключены классическими методами, может оказаться возможным построение стандартной кривой с использованием продукта того же типа, разбавленного или обработанного соответствующим образом для очистки от эндотоксинов. Испытание на эндотоксины может быть проведено с использованием полученной кривой.

Определено, что в большинстве случаев ультрафильтрация с использованием асимметрических мембранных фильтров, описанная в испытании на бактериальные эндотоксины, приводит к адекватным результатам. Фильтры должны пройти соответствующую валидацию в связи с тем, что производные целлюлозы (β-D-гликаны) при некоторых обстоятельствах могут обусловить получение ложных положительных результатов.

Установлено, что полисульфоновые фильтры, упоминавшиеся в предшествующем описании, являются непригодными, так как при их использовании были получены ложные положительные результаты.

9. ЦЕЛЬ ПРОВЕДЕНИЯ КОНТРОЛЬНЫХ ИСПЫТАНИЙ

Цель контроля, содержащего воду для ИБЭ и стандартный препарат эндотоксина с концентрацией, в два раза превышающей чувствительность лизата, указанную на этикетке, состоит в проверке активности лизата в условиях испытания во время его проведения. Целью отрицательного контроля является подтверждение отсутствия поддающейся определению концентрации эндотоксина в воде для ИБЭ.

Положительный контроль, в котором содержится испытуемый продукт в концентрации, используемой при проведении испытания, предназначен для демонстрации отсутствия мешающих факторов в условиях испытания во время его проведения.

10. РЕГИСТРАЦИЯ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Незначительные количества эндотоксина в воде для ИБЭ или в любом другом реагенте или материале, с которым лизат находится в контакте в ходе испытания, могут не определятся до тех пор, пока они не достигнут предела чувствительности лизата. Однако, они могут увеличить количество эндотоксина в растворе, содержащем испытуемый продукт, до значения, слегка превышающего предел чувствительности, и вызвать положительную реакцию.

Риск того, что это произойдет, может быть уменьшен путем проверки воды для ИБЭ и других реагентов и материалов с использованием наиболее чувствительного лизата из имеющихся в наличии, или, по крайней мере, более чувствительного,

чем лизат, использованный при проведении испытания продукта. Даже в этом случае риск такого «ложного положительного результата» не может быть полностью исключен. Следует, однако, понимать, что в этом отношении методика испытания является безопасной, в отличие от методики испытания, допускающей ложный отрицательный результат, который может привести к выпуску недоброкачественного продукта, опасного для здоровья пациента.

11. ЗАМЕНА ИСПЫТАНИЯ НА ПИРОГЕННОСТЬ НА КРОЛИКАХ ИСПЫТАНИЕМ НА БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ЭНДОТОКСИНЫ

В частных статьях, касающихся фармацевтической продукции, предназначенной для парентерального применения, которая может содержать токсические количества бактериальных эндотоксинов, содержатся требования о проведении испытания либо на бактериальные эндотоксины, либо на пирогенность с использованием кроликов. В общем случае:

11.1. В любой частной статье при необходимости проведения подобного испытания содержится только один тест, либо на пирогенность, либо на бактериальные эндотоксины.

11.2. При отсутствии доказательств обратного, испытание на бактериальные эндотоксины является предпочтительным по отношению к испытанию на пирогенность, так как обычно оно обеспечивает равную или лучшую защиту пациента.

11.3. Перед включением испытания на бактериальные эндотоксины в частную статью должны быть получены доказательства того, что один из методов, описанных в разделе *2.6.14*, является подходящим для испытания данного продукта.

11.4. Необходимую информацию предоставляют производители. Приветствуется предоставление компаниями любых имеющихся подтверждающих данных, касающихся применимости испытания на бактериальные эндотоксины к интересующим субстанциям и готовым формам. К таким данным относятся методы подготовки образцов и процедуры, необходимые для исключения мешающих факторов. Кроме того, должны быть предоставлены любые доступные параллельные данные по проведению испытания на пирогенность с использованием кроликов, которые могли бы подтвердить возможность замены испытания на пирогенность тестом на бактериальные эндотоксины.

Дополнительные требования приведены в следующих подразделах.

12. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ИСПЫТАНИЯ НА БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ЭНДОТОКСИНЫ, ОТЛИЧНОГО ОТ ПРЕДПИСАННОГО В ЧАСТНОЙ СТАТЬЕ

Если в частной статье предписывается проведение испытания на бактериальные эндотоксины, и не указан ни один из методов (A-F), описанных в разделе *2.6.14*, то для данного продукта была подтверждена пригодность метода A (предельное испытание методом гелевого сгустка). Если указан один из других методов (B-F), то для этого продукта была подтверждена пригодность указанного метода.

13. ВАЛИДАЦИЯ АЛЬТЕРНАТИВНЫХ МЕТОДОВ

Замена испытания на пирогенность на кроликах тестом на бактериальные эндотоксины, а также замена установленного или подразумеваемого метода определения бактериальных эндотоксинов другим следует считать использованием альтернативного метода взамен фармакопейного испытания. Общее положение

по использованию альтернативного метода взамен фармакопейного теста приведено в разделе «Общие положения»:

«Описанные испытания и методики количественного определения являются официальными методами, на которых основаны стандарты Фармакопеи. По соглашению с компетентными органами в целях контроля могут использоваться альтернативные методы анализа, при условии, что используемые методы позволяют сделать определенное заключение о том, может ли быть достигнуто согласие со стандартами статей, если бы были использованы официальные методы. В сомнительных и спорных случаях единственными надежными методами считают методы, приведенные в Фармакопее».

Для валидации метода испытания на бактериальные эндотоксины, отличного от подразумеваемого или указанного в частной статье, предлагаются следующие процедуры.

13.1. Процедура, материалы и реагенты, используемые при проведении испытания с применением лизата амебоцитов, должны пройти валидацию в соответствии с указаниями, приведенными в испытании на бактериальные эндотоксины.

13.2. Должно быть проведено испытание на наличие мешающих факторов (и, при необходимости, процедура по их исключению) на образцах, отобранных, по меньшей мере, из трех партий продукции. Следует иметь в виду, что в методах D и E, использующих хромогенный пептид, требуются реагенты, не используемые в методах A, B, C и F, и поэтому соответствие методов A, B, C и F требованиям, предъявляемым к мешающим факторам, не может быть без соответствующего подтверждения экстраполировано на методы D и E.

14. ВАЛИДАЦИЯ ИСПЫТАНИЯ ДЛЯ НОВЫХ ПРОДУКТОВ

Процедуры, описанные в пунктах 13.1 и 13.2, должны быть выполнены для всех новых продуктов, предназначенных для парентерального применения, которые, в соответствии с требованиями Фармакопеи, должны быть подвергнуты испытанию на наличие бактериальных эндотоксинов.

2.6.15. АКТИВАТОР ПРЕКАЛЛИКРЕИНА

Активатор прекалликреина (АПК) активирует прекалликреин, переводя его в калликреин, и может быть определен по его способности к отщеплению хромофора от синтетического пептидного субстрата в условиях, позволяющих определять скорость распада спектрофотометрическим методом; концентрация АПК вычисляется путем сравнения со стандартным препаратом, калиброванным в Международных Единицах.

За Международную Единицу принята активность установленного количества Международного Стандарта, представляющего собой лиофильно высушенный активатор прекалликреина. Эквивалентность Международного Стандарта в Международных Единицах устанавливается Всемирной организацией здравоохранения.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ СУБСТРАТА ПРЕКАЛЛИКРЕИНА

Для предотвращения активации коагуляции кровь или плазма, используемая для приготовления прекалликреина, должна контактировать только с пластиком или стеклянными поверхностями, обработанными силиконом.

9 объемов человеческой крови приливают к 1 объему антикоагулянтного раствора (ACD, CPD или раствора *цитрата натрия R* концентрацией 38 г/л), к которому добавлен *гексадиметрина бромид R* в количестве 1 мг/мл. Смесь центрифугируют при 3600 *g* в течение 5 минут. Отделяют плазму и снова центрифугируют при 6000 *g* в течение 20 минут для осаждения тромбоцитов. Плазму с уменьшенным содержанием тромбоцитов отделяют и подвергают диализу против 10 объемов буфера А в течение 20 часов. Диализированную плазму наносят на хроматографическую колонку, содержащую *агарозу-DEAE для ионообменной хроматографии R*, уравновешенную с помощью буфера А, в количестве, равном двойному объему плазмы. Колонку элюируют буфером А со скоростью 20 мл/см^2/ч. Собирают фракции элюата, регистрируя оптическую плотность при 280 нм (*2.2.25*). Фракции, содержащие первый пик белка, объединяют таким образом, чтобы объем объединенных фракций составлял 120% объема плазмы с пониженным содержанием тромбоцитов.

Проверяют отсутствие калликреиновой активности в объединенном растворе субстрата, смешивая его в соотношении 1:20 с предварительно подогретым раствором хромогенного субстрата, который будет использоваться в определении, и инкубируют при 37^{0}С в течение 2 минут. Субстрат может быть использован в испытании, если увеличение оптической плотности составляет менее 0,001 единицы в минуту. К собранному раствору добавляют *натрия хлорид R* в количестве 7 г/л и фильтруют через мембранный фильтр (пористость 0,45 мкм). Порции субстрата замораживают и хранят при температуре -25^{0}С; субстрат перед хранением может быть подвергнут высушиванию из замороженного состояния.

Все процедуры от начала хроматографии до заморозки порций субстрата выполняют в течение одного рабочего дня.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Определение предпочтительно выполнять с использованием автоматического анализатора ферментов при температуре 37^{0}С, используя такие объемы, концентрации субстратов и времена инкубации, чтобы скорость реакции находилась в линейной зависимости, по крайней мере, до концентрации 35 МЕ/мл. Стандарты, образцы и субстрат прекалликреина могут быть при необходимости разбавлены буфером В.

Разбавленные стандарты или образцы инкубируют с субстратом прекалликреина в течение 10 минут так, чтобы объем неразбавленного образца не превышал 1/10 общего объема инкубируемой смеси, во избежание ошибок, связанных с изменением ионной силы и показателя pH инкубируемой смеси. Смесь или ее часть инкубируют не менее, чем с равным объемом раствора подходящего синтетического хромогенного субстрата с установленной специфичностью к калликреину (например, *N-бензоил-L-пролил-L-фенилаланил-L-аргинина 4-нитроанилида ацетата R* или *D-пролил-L-фенилаланил-L-аргинина 4-нитроанилида дигидрохлорида R*), растворенного в буфере В. Регистрируют скорость изменения оптической плотности в минуту в течение промежутка времени от 2 до 10 минут при длине волны, специфичной для используемого субстрата. Для каждой смеси образца или стандарта готовят контроль, в котором вместо субстрата прекалликреина содержится буфер В.

Вносят поправки в значение ΔA/мин, вычитая результат, полученный для соответствующего контроля. Строят калибровочную кривую, используя значения, полученные таким образом для препарата сравнения в соответствующих концентрациях; используют полученную кривую для определения активности АПК в испытуемом препарате.

Буфер А

Трис-(гидроксиметил)-аминометан R	6,055 г
Натрия хлорид R	1,17 г
Гексадиметрина бромид R	50 мг
Натрия азид R	0,100 г

Растворяют ингредиенты в *воде R*, доводят значение pH до 8,0 с помощью *2М хлористоводородной кислоты* и разбавляют до 1000 мл *водой R*.

Буфер В

Трис-(гидроксиметил)-аминометан R	6,055 г
Натрия хлорид R	8,77 г

Растворяют ингредиенты в *воде R*, доводят значение pH до 8,0 с помощью *2М хлористоводородной кислоты* и разбавляют до 1000 мл *водой R*.

2.6.16. ИСПЫТАНИЯ НА ПОСТОРОННИЕ АГЕНТЫ В ВИРУСНЫХ ВАКЦИНАХ ДЛЯ МЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

Если для проведения испытания требуется предварительная нейтрализация вируса, используют специфические антитела, не происходящие от человека или обезьян; если выращивание вируса производилось на тканях птичьего происхождения, то антитела не должны, кроме того, происходить от птиц. Для приготовления антисыворотки используют иммунизирующий антиген, произведенный клеточной культурой, имеющей происхождение, отличное от происхождения вакцины, и не содержащей посторонних агентов. Если предписано использование яиц SPF, яйца отбирают из групп, не содержащих указанные патогены (*5.2.2*).

ВИРУСНЫЙ ПОСЕВНОЙ МАТЕРИАЛ

Образцы вирусного посевного материала отбирают во время его сбора и, если их не подвергают испытанию немедленно, хранят при температуре ниже -40°С.

Половозрелые мыши. Каждой из не менее 10 половозрелых мышей массой от 15 до 20 г вводят интрацеребрально 0,03 мл и внутрибрюшинно 0,5 мл вирусного посевного материала. Мышей наблюдают в течение не менее 21 дня. Производят вскрытие всех мышей, погибших или имеющих симптомы заболевания по окончании первых 24 часов испытания, и исследуют их на наличие признаков вирусной инфекции как путем прямого макроскопического осмотра, так и перепрививкой подходящих суспензий тканей интрацеребральным и внутрибрюшинным методами дополнительно не менее, чем пяти мышам, которых наблюдают в течение 21 дня. Вирусный посевной материал выдерживает испытание, если ни

одна мышь не обнаруживает симптомов инфекции, которая может быть вызвана посевным материалом. Результаты испытания считают достоверными, если не менее 80% привитых мышей выживают в течение периода наблюдения.

Новорожденные мыши. Каждой из не менее 20 мышей возрастом менее 24 часов вводят интрацеребрально 0,01 мл и внутрибрюшинно не менее 0,1 мл вирусного посевного материала. Мышей наблюдают ежедневно в течение не менее 14 дней. Производят вскрытие всех мышей, погибших или имеющих симптомы заболевания по окончании первых 24 часов испытания, и исследуют их на наличие признаков вирусной инфекции как путем прямого макроскопического осмотра, так и перепрививкой подходящих суспензий тканей интрацеребральным и внутрибрюшинным методами дополнительно не менее, чем пяти новорожденным мышам, которых наблюдают ежедневно в течение 14 дней. Вирусный посевной материал выдерживает испытание, если ни одна мышь не обнаруживает симптомов инфекции, которая может быть вызвана посевным материалом. Результаты испытания считают достоверными, если не менее 80% привитых мышей выживают в течение периода наблюдения.

Морские свинки. Каждой из не менее 5 морских свинок массой от 350 до 450 г вводят внутрибрюшинно 5,0 мл вирусного посевного материала. Животных наблюдают в течение не менее 42 дней, отмечая наличие симптомов заболевания. Производят вскрытие всех морских свинок, погибших или имеющих симптомы заболевания по окончании первых 24 часов испытания, и исследуют их макроскопически; ткани исследуют как микроскопически, так и культурально, отмечая наличие признаков инфекции. Животных, выживших в течение периода наблюдения, умерщвляют и исследуют аналогичным образом. Вирусный посевной материал выдерживает испытание, если ни одна морская свинка не обнаруживает признаков инфекции, которая может быть вызвана посевным материалом. Результаты испытания считают достоверными, если не менее 80% морских свинок выживают в течение периода наблюдения.

ВИРУСНЫЙ ПОСЕВНОЙ МАТЕРИАЛ И ВИРУСНЫЕ СБОРЫ

Образцы отбирают во время сбора и, если их не подвергают испытанию немедленно, хранят при температуре ниже -40^{0}С.

Бактериальная и грибковая стерильность. Образец объемом 10 мл должен выдерживать испытание на стерильность (*2.6.1*).

Микоплазмы. Образец объемом 10 мл должен выдерживать испытание на микоплазмы (*2.6.7*).

Микобактерии (*2.6.2*). Образец объемом 5 мл подвергают испытания на наличие *Mycobacterium* spp. методами культивирования, обладающими известной чувствительностью в отношении определения этих организмов.

Испытание клеточной культуры на другие посторонние агенты. Нейтрализованные образцы, эквивалентные 500 человеческим дозам, но не менее 50 мл, если иные количества не предписаны в частной статье, испытывают на присутствие посторонних агентов путем введения в непрерывные почечные обезьяньи и человеческие клеточные культуры. Если вирус выращен на человеческих диплоидных клетках, нейтрализованный вирусный сбор также испытывают на отдельной культуре диплоидных клеток. Если вирус вакцины выращен не на человеческой либо обезьяньей клеточной системе, то производят также инокуляцию клеток данного вида из отдельной партии. Клетки инкубируют при температуре

36±1^{0}С и наблюдают в течение 14 дней. Вирусный посевной материал или сбор выдерживает испытание, если ни в одной из клеточных культур не обнаруживается признаков любых посторонних агентов, не внесенных в результате случайной контаминации. Результаты испытания считают достоверными, если не менее 80% клеточных культур остаются жизнеспособными.

Птичьи вирусы (требуется только для вирусов, выращенных на тканях птичьего происхождения). Нейтрализуют образец, эквивалентный 100 человеческим дозам, но не менее 10 мл. Используя по 0,5 мл на каждое яйцо, инокулируют группу оплодотворенных яиц SPF возрастом от 9 до 11 дней аллантоисным путем, а другую группу, возрастом от 5 до 7 дней, - в желточный мешок. Инкубируют в течение 7 дней. Вирусный посевной материал или сбор выдерживает испытание, если в аллантоисных жидкостях и жидкостях желточных мешков не обнаруживаются гемагглютинирующие агенты и если ни один из эмбрионов и хориоаллантоисных мембран не обнаруживает макроскопической патологии. Результаты испытания считают достоверными, если не менее 80% привитых яиц выживают в течение 7 дней.

ПРОИЗВОДСТВЕННАЯ КЛЕТОЧНАЯ КУЛЬТУРА: КОНТРОЛЬНЫЕ КЛЕТКИ

Контрольные клетки изучают под микроскопом на отсутствие любой цитопатической дегенерации вирусного происхождения. Изучение проводят в течение периода инкубации, но не менее, чем в течение 14 дней после инокуляции. Результаты испытания считают достоверными, если не менее 80% контрольных клеточных культур выживают в течение периода наблюдения.

В момент последнего сбора вирусов, но не ранее, чем на 14-й день, выполняют нижеописанные испытания.

Испытание на гемадсорбирующие вирусы. Не менее 25% контрольных культур испытывают на наличие гемадсорбирующих вирусов путем добавления эритроцитов морских свинок. При необходимости, эритроциты морских свинок можно хранить при температуре 5±3^{0}С в течение не более 7 дней. Состояние половины культур оценивают после инкубации при температуре 5±3^{0}С в течение 30 минут, а состояние другой половины – после инкубации при температуре от 20 до 25^{0}С в течение 30 минут. Признаков присутствия гемадсорбирующих агентов не должно обнаруживаться.

Испытание клеточных культур на другие посторонние агенты. Собирают супернатанты контрольных клеток и испытывают на присутствие посторонних агентов путем введения в почечные обезьяньи и человеческие клеточные культуры. Если вирус вакцины выращен не на человеческой или обезьяньей клеточной системе, то производят также инокуляцию клеток данного вида, но из отдельной партии. На каждой клеточной системе испытывают не менее 5 мл. Инокулированные культуры инкубируют при температуре 36±1^{0}С и наблюдают в течение 14 дней. Признаков присутствия посторонних агентов не должно обнаруживаться.

Если производственная клеточная культура поддерживается при температуре, отличной от 36±1^{0}С, выполняют дополнительное испытание на посторонние агенты при этой температуре с использованием клеток того же типа, который используется для выращивания вируса.

КОНТРОЛЬНЫЕ ЯЙЦА

Гемагглютинирующие агенты. По 0,25 мл аллантоисной жидкости каждого из яиц испытывают на гемагглютинирующие агенты путем непосредственного смешивания с куриными красными кровяными тельцами и после засева яиц SPF,

выполняемого следующим образом: инокулируют объединенный образец амниотических жидкостей общим объемом 5 мл в аллантоисную и амниотическую полости яиц SPF. Объемы введения – по 0,5 мл. Контрольные яйца выдерживают испытание, если ни в одном случае не обнаруживаются признаки присутствия гемагглютинирующих агентов.

Вирусы птичьего лейкоза. Используют образец объединенных амниотических жидкостей контрольных яиц общим объемом 10 мл. Проводят усиление путем пяти пассажей на клеточных культурах куриных эмбрионов, не содержащих вирусов лейкоза; испытание на птичий лейкоз выполняют с использованием клеток, полученных в пятом пассаже. Контрольные яйца выдерживают испытание, если не обнаруживается признаков присутствия вирусов лейкоза.

Другие посторонние агенты. Образцы объединенных амниотических жидкостей контрольных яиц по 5 мл прививают на человеческие и обезьяньи клеточные культуры. Клеточные культуры наблюдают в течение 14 дней. Контрольные яйца выдерживают испытание, если не обнаруживается признаков присутствия посторонних агентов. Результаты испытания считают достоверными, если не менее 80% привитых культур выживают до окончания периода наблюдения.

2.6.17. ИСПЫТАНИЕ НА АНТИКОМПЛЕМЕНТАРНУЮ АКТИВНОСТЬ ИММУНОГЛОБУЛИНА

Для определения антикомплементарной активности (АКА) иммуноглобулина определенное количество испытуемого материала (10 мг иммуноглобулина) подвергают инкубации с определенным количеством комплемента морских свинок (20 CH_{50}), после чего титруют остаток комплемента; антикомплементарная активность выражается как поглощение комплемента, в процентах к контрольному образцу комплемента, принимаемому за 100%.

За гемолитическую единицу активности комплемента (CH_{50}) принимают такое его количество, которое в данных реакционных условиях приводит к лизису $2,5 \times 10^8$ из общего количества 5×10^8 оптимальным образом сенсибилизированных эритроцитов.

Основной раствор магния и кальция. 1,103 г *хлорида кальция R* и 5,083 г *хлорида магния R* растворяют в воде и разбавляют до 25 мл тем же растворителем.

Основной буферный раствор барбитала. 207,5 г *хлорида натрия R* и 25,48 г *барбитала натриевой соли R* растворяют в 4000 мл *воды R* и доводят значение pH до 7,3 *1М хлористоводородной кислотой.* Добавляют 12,5 мл основного раствора кальция и магния и разбавляют *водой R* до 5000 мл. Фильтруют через мембранный фильтр (размер пор 0,22 мкм). Хранят при 4^0C в стеклянных контейнерах.

Раствор желатина. 12,5 г желатина растворяют приблизительно в 800 мл *воды R* и нагревают на водяной бане до кипения. Охлаждают до 20^0C и разбавляют до 10 л *водой R.* Фильтруют через мембранный фильтр (размер пор 0,22 мкм). Хранят при 4^0C. Использованию подлежат только прозрачные растворы.

Раствор цитрата. 8,0 г *цитрата натрия R*, 4,2 г *хлорида натрия R* и 20,5 г *глюкозы R* растворяют в 750 мл *воды R*. Доводят значение pH до 6,1 раствором *лимонной кислоты R* концентрацией 100 г/л и разбавляют *водой R* до 1000 мл.

Буферный раствор желатина и барбитала. 4 объема раствора желатина добавляют к 1 объему основного буферного раствора барбитала и перемешивают. При необходимости доводят значение pH до 7,3, используя *1 М раствор гидроксида натрия* или *1 М хлористоводородную кислоту*. Хранят при 4^0С. Ежедневно готовят свежие растворы.

Стабилизированная овечья кровь. Смешивают равные объемы овечьей крови и раствора цитрата и перемешивают. Хранят при 4^0С не менее 7 и не более 28 дней. (Стабилизированная овечья кровь и эритроциты овцы доступны в различных коммерческих источниках).

Гемолизин. Антисыворотку против красных кровяных телец овцы готовят с использованием кроликов. (Такие антисыворотки доступны в различных коммерческих источниках).

Комплемент морских свинок. Готовят пул сыворотки из крови не менее 10 морских свинок. Сыворотку отделяют от свернувшейся крови центрифугированием при температуре около 4^0С. Сыворотку хранят в небольших количествах при температуре ниже -70^0.

МЕТОД

Приготовление стандартизированной 5% суспензии эритроцитов овцы. Эритроциты овцы отделяют центрифугированием соответствующего объема стабилизированной овечьей крови, промывают не менее трех раз буферным раствором желатина и барбитала и готовят в том же растворе суспензию с содержанием клеток 5 объемных процентов. Плотность клеток в суспензии определяют следующим образом: 0,2 мл добавляют к 2,8 мл *воды R* и центрифугируют лизированный раствор 5 минут при 1000 *g*; плотность клеток соответствует требованиям, если оптическая плотность (*2.2.25*) супернатанта при 541 нм составляет 0,62±0,01. Плотность клеток корректируют добавлением буферного раствора желатина и барбитала в соответствии с формулой:

$$V_f = \frac{V_i \cdot A}{0,62},$$

где :

V_f - окончательный объем после коррекции,

V_i - исходный объем,

A - оптическая плотность исходной суспензии при 541 нм.

Суспензия после коррекции содержит около 1×10^9 клеток в миллилитре.

Титрование гемолизина

Готовят разведения гемолизина в соответствии с Таблицей 2.6.17.-1.

Таблица 2.6.17.-1

Требуемое разведение гемолизина	Готовят с использованием		
	Буферный раствор желатина и барбитала		Гемолизин
	Объем (мл)	Разведение (1 : …)	Объем (мл)
7,5	0,65	неразбавленный	0,1

10	0,90	неразбавленный	0,1
75	1,80	7,5	0,2
100	1,80	10	0,2
150	1,00	75	1,0
200	1,00	100	1,0
300	1,00	150	1,0
400	1,00	200	1,0
600	1,00	300	1,0
800	1,00	400	1,0
1200	1,00	600	1,0
1600	1,00	800	1,0
2400	1,00	1200	1,0
3200*	1,00	1600	1,0
4800*	1,00	2400	1,0
*1,0 мл смеси отбрасывают			

К каждой пробирке из серии разведении гемолизина, начиная с разведения 1:75, добавляют по 1,0 мл 5% суспензии эритроцитов овцы и перемешивают. Инкубируют при 37^0С в течение 30 минут.

По 0,2 мл каждой из этих инкубированных смесей переносят в новые пробирки и добавляют по 1,10 мл буферного раствора желатина и барбитала и по 0,2 мл разбавленного комплемента морских свинок (например, в разведении 1:150). Эти операции выполняют дважды.

В качестве контрольного образца негемолизированных клеток готовят три пробирки, содержащие по 1,4 мл буферного раствора желатина и барбитала и 0,1 мл 5% суспензии эритроцитов овцы.

В качестве полностью гемолизированного контрольного образца готовят три пробирки, содержащие по 1,4 мл *воды R* и 0,1 мл 5% суспензии эритроцитов овцы.

Все пробирки инкубируют при 37^0С в течение 60 минут и центрифугируют 5 минут при 1000 *g*. Измеряют оптическую плотность (*2.2.25*) супернатантов при 541 нм и вычисляют для каждой из пробирок степень гемолиза, в процентах, по формуле:

$$\frac{A_a - A_1}{A_b - A_1} \times 100,$$

где :

A_a - оптическая плотность в пробирках с разведениями гемолизина,

A_b - средняя оптическая плотность в трех пробирках с полным гемолизом,

A_1 - средняя оптическая плотность в трех пробирках без гемолиза.

На миллиметровой бумаге строят график зависимости степени гемолиза в процентах (по оси ординат) от обратного значения соответствующего разведения гемолизина (по оси абсцисс). Определяют из графика оптимальное разведение гемолизина. Выбирают разведение таким образом, чтобы дальнейшее увеличение количества гемолизина не приводило бы к существенному изменению степени гемолиза. Это разведение принимают за одну минимальную гемолитическую единицу (1 МГЕ) в 1,0 мл. Оптимальное гемолитическое разведение гемолизина для приготовления сенсибилизированных эритроцитов овцы составляет 2 МГЕ/мл.

Результат титрования гемолизина считают достоверным при условии, что максимальная степень гемолиза составляет от 50 до 70%. Если максимальная степень гемолиза не находится в этих пределах, титрование повторяют с использованием более или менее разбавленного раствора комплемента.

Приготовление оптимизированных сенсибилизированных эритроцитов (гемолитической системы).

Готовят подходящий объем разбавленного гемолизина с содержанием 2 МГЕ/мл и равный объем стандартизированной 5% суспензии эритроцитов овцы. Добавляют разведение гемолизина к стандартизированной суспензии клеток и перемешивают. Инкубируют при 37^{0}C в течение 15 минут, после чего хранят при температуре от 2^{0}C до 8^{0}C и используют в течение 6 часов.

Титрование комплемента

Готовят подходящее разведение комплемента (например, 1:250) с использованием буферного раствора желатина и барбитала и выполняют титрование в двух повторностях в соответствии с Таблицей 2.6.17.-2.

Таблица 2.6.17.-2.

Номер пробирки	**Объем разведения комплемента (например, 1:250), в мл**	**Объем буферного раствора желатина и барбитала, в мл**
1	0,1	1,2
2	0,2	1,1
3	0,3	1,0
4	0,4	0,9
5	0,5	0,8
6	0,6	0,7
7	0,7	0,6
8	0,8	0,5
9	0,9	0,4
10	1,0	0,3
11	1,1	0,2
12	1,2	0,1
Три пробирки в качестве контроля – гемолиз 0%	–	1,3
Три пробирки со 100% гемолизом	–	1,3 мл воды

К содержимому каждой пробирки добавляют по 0,2 мл сенсибилизированных эритроцитов овцы, хорошо перемешивают и инкубируют при 37^{0}C в течение 60 минут. Пробирки охлаждают на ледяной бане и центрифугируют 5 минут при 1000 *g*. Измеряют оптическую плотность супернатанта при 541 нм и вычисляют степень гемолиза (Y) по формуле:

$$\frac{A_c - A_1}{A_b - A_1},$$

где :

A_c - оптическая плотность в пробирках 1–12,

A_b - средняя оптическая плотность в пробирках со 100% гемолизом,

A_1 - средняя оптическая плотность в контролях с 0% гемолизом.

На миллиметровой бумаге с логарифмическим масштабом по обеим осям строят график со значениями Y/(1-Y) на оси абсцисс и количеством разведенного комплемента на оси ординат. Строят наилучшую прямую, соответствующую нанесенным точкам и определяют ординату для дозы комплемента, приводящей к 50% гемолизу, т.е. Y/(1-Y) = 1,0. Вычисляют активность, в гемолитических единицах (CH_{50}/мл) по формуле:

$$\frac{C_d}{C_a \cdot 5},$$

где :

C_d - обратное значение разведения комплемента,

C_a - объем, в мл, разведенного комплемента, приводящий к 50% гемолизу,

5 - масштабный множитель для учета количества эритроцитов.

Испытание на антикомплементарную активность

Готовят разведение комплемента, содержащее 100 CH_{50}/мл, путем разбавления титрованного комплемента морских свинок буферным раствором желатина и барбитала. При необходимости, доводят значение pH испытуемого иммуноглобулина до 7. Для иммуноглобулина с содержанием 50 мг/мл готовят следующие смеси для инкубации:

Таблица 2.6.17.-3

	Испытуемый образец иммуноглобулина	Контроль комплемента (2 образца)
Иммуноглобулин (50 мг/мл)	0,2 мл	–
Буферный раствор желатина и барбитала	0,6 мл	0,8 мл
Комплемент	0,2 мл	0,2 мл

Проводят испытание испытуемого образца иммуноглобулина и готовят положительный и отрицательный контроли АКА с использованием стандартного образца *человеческого иммуноглобулина BRP*, в соответствии с указаниями на листке-вкладыше, сопровождающем стандартный препарат. Если концентрация иммуноглобулина отличается от 50 мг/мл, используют большие либо меньшие объемы образца и буферного раствора желатина и барбитала; например, при концентрации иммуноглобулина 30 мг/мл, к 0,33 мл его раствора добавляют 0,47 мл буферного раствора желатина и барбитала с получением 0,8 мл. Пробирки укупоривают и инкубируют при 37^{0}C в течение 60 минут. По 0,2 мл каждой из инкубированных смесей добавляют к 9,8 мл буферного раствора желатина и барбитала для разбавления комплемента. Вышеописанную операцию титрования комплемента проводят для каждой из пробирок, определяя остаточную активность ком-

племента (Таблица 2.6.17.-2). Антикомплементарную активность испытуемого препарата вычисляют относительно контроля комплемента, принимаемого за 100%, по формуле:

$$\frac{a-b}{a} \cdot 100,$$

где :

a - средняя активность комплемента, в CH_{50}/мл, в контролях комплемента,

b - активность комплемента, в CH_{50}/мл, в испытуемом образце.

Результаты испытания считают достоверными, если

- антикомплементарные активности, определенные для АКА-отрицательного и АКА-положительного контролей находятся в пределах, указанных в листке-вкладыше, сопровождающем стандартный образец,
- активность комплемента в контроле комплемента (a) находится в пределах от 80 до 120 CH_{50}/мл.

2.6.18. ИСПЫТАНИЕ ЖИВЫХ ВИРУСНЫХ ВАКЦИН НА НЕЙРОВИРУЛЕНТНОСТЬ

В каждом испытании используют не менее десяти серонегативных по отношению к испытуемому вирусу обезьян. Каждой из обезьян в таламический отдел каждого полушария вводят не менее 0,5 мл испытуемого материала, если иное не предписано в частной статье. Общее количество привитого каждой обезьяне вируса не должно быть менее количества, содержащегося в рекомендованной единичной человеческой дозе вакцины. Для проверки наличия диких нейровирулентных вирусов контрольную группу, состоящую не менее чем из четырех обезьян, содержат в тех же клетках, что и группу привитых обезьян, или в непосредственной близости от них. Привитых обезьян наблюдают в течение 17–21 дней, отмечая возникновение паралича и других неврологических симптомов; обезьян из контрольной группы наблюдают в течение того же периода и дополнительно 10 дней. Животные, погибшие в течение первых 48 часов после инъекции, считаются погибшими по причинам неспецифического характера и могут быть заменены другими. Результаты испытания признают недостоверными, если: более 20% привитых обезьян погибают по неспецифическим причинам; образцы сыворотки, отобранные у обезьян контрольной группы, в момент прививки испытуемых животных и через 10 дней после умерщвления последних, имеют признаки инфекции, вызванной диким вирусом испытуемого типа или вирусом кори. По окончании периода наблюдения выполняют вскрытие и гистопатологическое изучение соответствующих отделов мозга на предмет наличия воздействия на центральную нервную систему. Материал выдерживает испытание, если не обнаруживается неожиданных клинических и гистопатологических признаков воздействия на центральную нервную систему, которые могут быть вызваны введенным вирусом.

2.6.19. ИСПЫТАНИЕ ПЕРОРАЛЬНОЙ ВАКЦИНЫ ПОЛИОМИЕЛИТА НА НЕЙРОВИРУЛЕНТНОСТЬ

Обезьяны, используемые в испытании на нейровирулентность, должны соответствовать требованиям, приведенным в частной статье «*Вакцина полиомиелита, пероральная (0215)*» и иметь массу тела не менее 1,5 кг. Патогенность для обезьян семейств *Macaca* или *Cercopithecus* испытывается в сравнении с патогенностью стандартного вирусного препарата для испытания на нейровирулентность путем введения в поясничный отдел центральной нервной системы после седации с использование подходящего агента, например, гидрохлорида кетамина. Для образца сыворотки, отобранного до инъекции, должно быть показано отсутствие нейтрализующих антител в разведении 1:4 при испытании против не более, чем 1000 $CCID_{50}$ каждого из трех типов полиовируса.

Количество обезьян. Вакцину и подходящий гомотипический вирус сравнения испытывают одновременно в одной и той же группе обезьян. Вакцину и препарат сравнения вводят равному количеству животных. Животных с различающимися типами введенного препарата размещают случайным образом по клеткам, а их принадлежность кодируется таким образом, чтобы тип полученной ими прививки был скрыт от наблюдателей. Количество привитых обезьян должно быть таково, чтобы при оценке как вакцины, так и препарата сравнения было включено не менее одиннадцати обезьян, положительных по отношению к вирусу типов 1 и 2, и не менее восемнадцати обезьян, положительных по отношению к вирусу типа 3 (положительными считают обезьян, имеющих специфические нейронные повреждения, вызванные полиовирусом в центральной нервной системе). С одним и тем же гомотипическим стандартом могут испытываться несколько партий вакцины. По возможности, используют обезьян из одной и той же карантинной группы. В других случаях используют обезьян из двух групп, причем вакцина и препарат сравнения прививаются равному количеству обезьян из каждой группы. Если испытание проводится в течение двух рабочих дней, в каждый из дней вакциной и гомотипическим препаратом сравнения прививают равное количество обезьян.

Содержание вируса. Содержание вируса в вакцине и гомотипическом препарате сравнения регулируют таким образом, чтобы они были насколько возможно близки и находились в пределах от $10^{5.5}$ до $10^{6.5}$ $CCID_{50}$ в 0,1 миллилитре.

Наблюдение. Всех обезьян наблюдают в течение 17–22 дней, отмечая признаки полиомиелита или других вирусных инфекций. Обезьян, выживших в течение первых 24 часов, но погибших до 11-го дня после прививки, подвергают вскрытию для определения того, являлся ли причиной гибели полиомиелит. Животные, погибшие по причинам, не связанным с полиомиелитом, не учитываются при оценке результатов. Умирающих и в тяжелой степени парализованных животных умерщвляют и вскрывают. Также вскрывают всех животных, выживших в течение периода наблюдения. Результаты испытания считают недостоверными, если более, чем у 20% животных в течение периода наблюдения была обнаружена интеркуррентная инфекция.

Количество срезов, подлежащих испытанию. Гистологическому исследованию подлежат, как минимум, поясничный и шейный отделы, верхний и нижний продолговатый мозг, средний мозг, зрительный бугор и двигательная область коры головного мозга каждой обезьяны. Отбирают препараты толщиной 15 мкм и окрашивают их галлоцианином. Минимальные количества подлежащих испытанию срезов составляют:

(a) 12 срезов, репрезентативных для поясничного утолщения,

(b) 10 срезов, репрезентативных для шейного утолщения,

(c) 2 среза продолговатого мозга,

(d) 1 срез моста и мозжечка,

(e) 1 срез среднего мозга,

(f) 1 срез с левой и правой части зрительного бугра,

(g) 1 срез с левой и правой части двигательной области коры головного мозга.

Подсчет вирусной активности. Для оценки вирусной активности в полусекциях поясничного корда и ствола мозга используют систему подсчета тяжести повреждений, по которой следующим образом дифференцируют клеточную инфильтрацию и разрушение нейронов:

1. Наличие лишь клеточной инфильтрации (обезьяна не считается положительной),

2. Клеточная инфильтрация с минимальным повреждением нейронов,

3. Клеточная инфильтрация со значительным повреждением нейронов,

4. Массовое повреждение нейронов в сочетании или без клеточной инфильтрации.

Полученные значения записывают на стандартном бланке (пример подходящей формы имеется в разделе «Требования к вакцине полиомиелита (пероральной)» в Требованиях к биологическим субстанциям №7 Всемирной организации здравоохранения). Обезьяна, на срезах тканей которой имеются поврежденные нейроны, но не имеется игольчатых трактов, считается положительной. Обезьяна, на срезах тканей которой имеются игольчатые тракты, но не имеется поврежденных нейронов, не считается положительной. Срезы, на которых имеются повреждения травматического происхождения, но не имеется специфических вирусных повреждений, при подсчете не учитываются.

Уровни тяжести повреждений основаны на данных, полученных при изучении полусекций поясничных (L), шейных (C) и мозговых (B) гистологических срезов. Для каждой положительной обезьяны рассчитывают уровень повреждений (LS) по формуле

$$LS = \left\{\left[\frac{\text{Суммарное число L}}{\text{Число полусекций}}\right] + \left[\frac{\text{Суммарное число C}}{\text{Число полусекций}}\right] + \left[\frac{\text{Суммарное число C}}{\text{Число полусекций}}\right]\right\} \div 3:$$

Для каждой группы положительных обезьян рассчитывают среднее значение уровня повреждений.

Оценка. Сравнение вирусной активности в вакцине и в препарате сравнения основано на активности в поясничном расширении корда и степени распространения активности из этого региона в шейное расширение и головной мозг. Положительное или отрицательное решение основано на общем уровне для всех животных, подвергнутых испытанию. Необычно высокая активность как в поясничном отделе, так и в результате распространения из этого региона, обнаруженная у отдельных животных, также должна приниматься во внимание при вынесении окончательного решения. Моновалентный материал выдерживает испытание, если имеется требуемое количество положительных животных и если ни в одном из клинических и гистопатологических исследований не выявлено существенных различий в патогенности между вирусом вакцины и препаратом сравнения. Критерии положительного решения приведены ниже.

Критерии. Для каждой из вакцин сравнения (типов 1, 2 и 3) проводят подходящее количество (например, четыре) квалификационных испытаний на вирулентность с целью получения данных об активности этих вакцин как основы критериев для оценки испытуемых вакцин. Для повторных испытаний каждого из стандартных вирусов вычисляют общий средний уровень повреждений (*M*), а также суммарную оценку дисперсии (s^2) и отклонения (*s*) результатов испытания.

Критерии достоверности результатов испытания препарата сравнения устанавливаются на основе данных, накопленных в квалификационных испытаниях. Общепринятых критериев не имеется; для лабораторий с ограниченным опытом работы может быть полезен следующий эмпирический метод установления допустимых пределов среднего уровня повреждений для препарата сравнения (X_{ref}):

Таблица 2.6.19.-1

	Нижний предел	Верхний предел
Типы 1 и 2	$M - s$	$M + s$
Тип 3	$M – s/2$	$M + s$

Если средний уровень повреждений испытуемой вакцины равен X_{test}, а C_1, C_2 и C_3 – константы, определенные ниже, то:

Вакцина не выдерживает испытание при:

$$X_{test} - X_{ref} > C_1$$

Вакцина может быть однократно подвергнута повторному испытанию при:

$$C_1 < X_{test} - X_{ref} < C_2$$

Если вакцина испытывается повторно, средние значения уровней повреждений для испытуемой вакциной и препаратом сравнения рассчитываются заново. Вакцина не выдерживает испытание при:

$$\frac{X_{(test1+test2)} - X_{(ref1+ref2)}}{2} > C_3$$

Константы C_1, C_2 и C_3 вычисляют по формулам:

$$C_1 = 2{,}3\sqrt{\frac{2s^2}{N_1}}$$

$$C_2 = 2{,}6\sqrt{\frac{2s^2}{N_1}}$$

$$C_3 = 1{,}6\sqrt{\frac{2s^2}{N_2}},$$

где :

N_1 - количество положительных обезьян при испытании вакцины,

N_2 - количество положительных обезьян в двух испытаниях,

2,3 - нормальное отклонение для 1% уровня,

2.6 - нормальное отклонение для 0,5% уровня,

1.6 нормальное отклонение для 5% уровня.

Испытание на нейровирулентность, в котором получен средний уровень повреждений препарата сравнения (X_{ref}), несовместимый с предшествующим опытом, не используется для оценки испытуемой вакцины. Если результаты испытания достоверны, вычисляют средний уровень повреждений для испытуемой вакцины (X_{test}) и сравнивают его с соответствующим значением для гомотипической стандартной вакцины.

2.6.20. АНТИ-А И АНТИ-В ГЕМАГГЛЮТИНИНЫ (НЕПРЯМОЙ МЕТОД)

Готовят два серийных разведения испытуемого препарата в растворе *натрия хлорида R* концентрацией 9 г/л. К каждому разведению одного ряда добавляют равный объем суспензии эритроцитов группы A_1 концентрацией 5 объемных процентов, предварительно трижды промытых раствором натрия хлорида. К каждому разведению другого ряда добавляют равный объем суспензии эритроцитов группы В концентрацией 5 объемных процентов, предварительно трижды промытых раствором натрия хлорида. Суспензии инкубируют при температуре 37^0C в течение 30 минут, затем клетки трижды промывают раствором натрия хлорида. Клетки оставляют в контакте с поливалентным антиреагентом человеческого иммуноглобулина в течение 30 минут. Каждую из суспензий, не подвергая центрифугированию, исследуют под микроскопом на агглютинацию.

2.6.21. МЕТОДЫ АМПЛИФИКАЦИИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

1. ВВЕДЕНИЕ

Методы амплификации нуклеиновых кислот основаны на двух различных подходах:

1. Амплификация последовательности-мишени нуклеиновой кислоты с использованием, например, полимеразной цепной реакции (ПЦР), лигазной цепной реакции (ЛЦР) или изотермической амплификации рибонуклеиновой кислоты (РНК).

2. Амплификация сигнала гибридизации с использованием, например, для дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) метода разветвленной ДНК (bDNA). В этом случае амплификация сигнала достигается без подвергания нуклеиновой кислоты повторяющимся циклам амплификации.

В данном общем разделе в качестве стандартного метода описывается метод ПЦР. Могут применяться и альтернативные методы, если они выдерживают требования к качеству, перечисленные ниже.

2. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

В данном разделе устанавливаются требования к подготовке образца, к амплификации *in vitro* последовательностей ДНК и к детектированию специфического продукта ПЦР. С помощью ПЦР могут быть детектированы определенные последовательности ДНК. Последовательности РНК могут также быть детектированы путем обратной транскрипции РНК на комплементарную ДНК (cDNA) с последующей амплификацией.

3. ПРИНЦИП МЕТОДА

ПЦР представляет собой процедуру, позволяющую производить в условиях *in vitro* амплификацию сегментов ДНК или РНК (после обратной транскрипции на cDNA).

После денатурации двунитевой ДНК в однонитевую два синтетических олигонуклеотидных праймера противоположной полярности спариваются с их соответствующими комплементарными последовательностями в подлежащей амплификации ДНК. Короткие двунитевые участки, формирующиеся в результате специфического спаривания оснований праймеров и комплементарной ДНК-последовательности, образуют границы амплифицируемого сегмента ДНК и служат начальными точками для синтеза ДНК *in vitro* с участием термостабильной ДНК-полимеразы.

Процесс амплификация ДНК состоит из циклов, включающих:

- тепловую денатурацию нуклеиновой кислоты (последовательности-мишени) на две отдельные нити;

- специфический отжиг последовательности-мишени с праймерами в подходящих реакционных условиях;

- наращивание праймеров, присоединенных к обеим отдельным нитям, под воздействием ДНК-полимеразы при подходящей температуре (синтез ДНК).

Повторяющиеся циклы тепловой денатцурации, отжига с праймерами и синтеза ДНК приводят к экспоненциальной амплификации сегмента ДНК, ограниченного праймерами.

Специфический продукт ПЦР, называемый ампликоном, может быть определен разнообразными методами соответствующей специфичности и чувствительности.

4. ИСПЫТУЕМЫЙ МАТЕРИАЛ

В связи с высокой чувствительностью ПЦР, образцы должны быть оптимальным образом защищены от попадания извне последовательностей-мишеней. Отбор проб, хранение и транспортировку испытуемого материала производят в условиях, минимизирующих деградацию последовательности-мишени. В случае проведения испытания на РНК-последовательности, необходимо принять особые меры предосторожности ввиду высокой чувствительности РНК к деструктивному воздействию рибонуклеаз. Следует учитывать, что некоторые добавляемые реагенты, например, антикоагулянты или консерванты, могут оказывать влияние на ход определения.

5. МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ

5.1. Предотвращение загрязнения

В связи с риском загрязнения следует строго разграничивать рабочие зоны в зависимости от используемых материалов и применяемой технологии. Учитываемые факторы включают передвижение персонала, использование спецодежды, перемещение материалов, подачу воздуха и процедуры деконтаминации.

Систему следует разделить на такие отсеки, как:

- зона основной смеси (зона, в которой работы осуществляются только с материалами, не содержащими шаблонных последовательностей, например, праймерами, буферными растворами и т.д.),

- пре-ПЦР (зона, в которой ведется работа с реагентами, образцами и контролями),

- ПЦР-амплификация (амплифицируемый материал содержится в закрытой системе),

- пост-ПЦР детектирование (единственная зона, в которой операции с амплифицируемым материалом производятся в открытой системе).

5.2 Подготовка образцов

При подготовке образцов подлежащая амплификации последовательность-мишень должна быть эффективным и воспроизводимым образом экстрагирована или высвобождена из испытуемого материала так, чтобы амплификация в избранных реакционных условиях была осуществима. Могут быть использованы различные физико-химические процедуры экстракции и/или обогащения.

Добавки, присутствующие в испытуемом материале, могут оказывать влияние на ход ПЦР. Для контроля присутствия ингибиторов в испытуемом материале следует провести процедуры, описанные в пункте 7.3.2.

В случае РНК-матриц следует уделять внимание предотвращению проявления рибонуклеазной активности.

5.3 Амплификация

Амплификация последовательности-мишени методом ПЦР проводится в оптимизированных циклически изменяющихся условиях (температурный профиль для денатурации двунитевой ДНК, отжига и наращивания праймеров; периоды инкубации при выбранных температурах; скорость наращивания). Эти условия зависят от различных параметров, например:

- длины и состава праймера и последовательности-мишени;
- типа ДНК-полимеразы, буферной смеси и реакционного объема, используемых при амплификации;
- типа используемого устройства для термоциклирования и скорости передачи тепла между аппаратом, реакционным сосудом и реакционной жидкостью.

5.4 Детектирование

Ампликон, образовавшийся в результате ПЦР, может быть идентифицирован по размеру, последовательности, путем химической модификации или комбинацией этих методов. Характеризация по размеру может быть проведена методами гель-электрофореза (с использованием слоев агарозного или полиакриламидного гелей или капиллярного электрофореза) или колоночной хроматографии (например, ВЭЖХ). Характеризация по составу последовательности может быть проведена путем специфической гибридизации зондов, содержащих последовательность, комплементарную мишени, или расщеплением амплифицированного материала, отражающим наличие мишень-специфических сайтов ферментативной рестрикции. Характеризация по химической модификации может быть проведена, например, введением в ампликоны флуорофора с дальнейшей детекцией флуоресценции, возникающей в результате возбуждения.

6. ОЦЕНКА И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результат испытания является достоверным лишь при условии получения однозначно положительных результатов для положительного контроля (контролей) и однозначно отрицательных результатов для отрицательного контроля (контролей). В связи с исключительно высокой чувствительностью метода ПЦР и с риском попадания загрязняющих примесей, положительные результаты должны подтверждаться двукратным полным повторением проце-

дуры испытания, по возможности, с новой аликвотой образца. Считают, что образец дает положительную реакцию, если не менее одного из повторных испытаний дает положительный результат.

7. ОБЕСПЕЧЕНИЕ КАЧЕСТВА

7.1 Валидация системы для количественного определения методом ПЦР.

Программа валидации должна включать валидацию оборудования и используемого метода ПЦР. Следует учитывать положения, изложенные в руководстве ICH (тема Q2B) «Валидация аналитического метода: методология».

Для валидации ПЦР-испытания обязательным является применение официальных рабочих стандартных образцов или стандартных препаратов внутреннего применения, калиброванных относительно Международных Стандартов, для последовательностей-мишеней, для определения которых система будет использоваться.

При валидации должно быть определено положительное граничное значение. Положительное граничное значение определяется как минимальное количество последовательностей-мишеней в объеме образца, которые могут быть определены в 95% испытаний. Положительное граничное значение зависит от таких взаимосвязанных факторов, как объем экстрагированного образца и эффективность методологии экстракции, транскрипция РНК-мишени в cDNA, процесс амплификации и детекции.

При определении предела детекции системы следует учитывать положительные граничные значения для каждой последовательности-мишени и результаты проведения испытания выше и ниже этих значений.

7.2. Контроль качества реагентов.

Все реагенты, имеющие критическое значение для используемой методологии, должны проходить контроль перед использованием в рутинных испытаниях. Их пригодность или непригодность основывается на заранее определенных критериях качества.

Праймеры являются важнейшими компонентами ПЦР-анализа, и поэтому следует уделять особое внимание их строению, чистоте и валидации для ПЦР-анализов. Каждая новая партия праймеров перед введением в испытание должна быть испытана на специфичность, эффективность амплификации и отсутствие ингибирующих примесей. Праймеры могут быть подвергнуты модификации (например, связыванием с флуорофором или антигеном) для проведения детекции ампликона специфическими методами при условии, что такие модификации не приведут к ингибированию правильного и эффективного протекания процесса амплификации последовательности-мишени.

7.3. Контроль хода испытания.

7.3.1. Внешние контроли.

Для минимизации риска загрязнения и обеспечения адекватной чувствительности в состав каждого ПЦР-испытания вводят следующие внешние контроли:

- положительный контроль: в нем содержится определенное количество копий последовательности-мишени; количество копий определяется индивидуально для каждой системы и кратно положительному граничному значению данной системы;

- отрицательный контроль: образец аналогичного основного состава, для которого доказано отсутствие последовательностей-мишеней.

7.3.2. Внутренний контроль.

Внутренние контроли представляют собой определенные последовательности нуклеиновых кислот, содержащие сайты связывания с праймерами. Внутренние контроли должны амплифицироваться так же эффективно, как и испытуемая последовательность-мишень, но ампликоны должны иметь четкие отличия. Тип нуклеиновой кислоты (ДНК/РНК), используемой в качестве внутреннего контроля, должен быть тем же, что и в испытуемом материале. Внутренний контроль предпочтительно добавлять к испытуемому материалу до выделения нуклеиновой кислоты; при этом он может использоваться для общего контроля процесса (экстракция, обратная транскрипция, амплификация, детекция).

7.4. Внешняя оценка качества

Участие во внешних программах оценки качества представляет собой важную процедуру обеспечения качества ПЦР-анализов для каждой лаборатории и каждого оператора.

Следующий раздел приводится для информации.

ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДА АМПЛИФИКАЦИИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ (МАНК) В ОПРЕДЕЛЕНИИ РНК ВИРУСА ГЕПАТИТА С (HCV) В ПУЛАХ ПЛАЗМЫ: РУКОВОДСТВО

1. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Большинство аналитических методик, основанных на амплификации нуклеиновых кислот, представляют собой качественные испытания на наличие нуклеиновых кислот. Существует также некоторое количество методик количественного определения (либо внутренних, либо коммерчески доступных). Для определения загрязнения пулов плазмы РНК HCV адекватными являются качественные тесты, которые могут быть рекомендованы как предельные испытания при контроле содержания примесей, в соответствии с указаниями в Техническом руководстве по разработке монографий «Pharmeuropa», декабрь 1999, глава III «Валидация аналитических методик». В этом руководстве описаны лишь методы валидации качественных аналитических методик оценки загрязнения пулов плазмы РНК HCV на основе амплификации нуклеиновых кислот. Поэтому двумя наиболее важными характеристиками для валидации аналитического метода являются его специфичность и предел детекции. Кроме того, должна быть оценена устойчивость аналитического метода.

Однако этот документ также может быть использован в качестве основы для валидации амплификации нуклеиновых кислот в общем.

Для целей данного документа, за аналитическую процедуру принимают всю процедуру от экстракции нуклеиновой кислоты до детекции амплифицированного продукта.

При использовании в аналитическом методе или его части коммерческого набора, валидацию пользователя может заменить документированное подтверждение валидации вышеуказанных положений, произведенной изготовителем набора. Тем не менее, пользователем должна быть продемонстрирована производительность набора в отношении его предполагаемого использования (т.е. предел детекции, устойчивость, перекрестная контаминация).

2. СПЕЦИФИЧНОСТЬ

Специфичность представляет собой способность к однозначной оценке присутствия нуклеиновой кислоты в смеси с компонентами, присутствие которых можно ожидать.

Специфичность аналитических методов, основанных на амплификации нуклеиновых кислот, зависит от выбора праймеров, выбора зонда (для анализа конечного продукта) и обоснованности условий проведения испытания (как для стадии амплификации, так и для стадии детекции).

При разработке праймеров и зондов должна быть исследована их специфичность в отношении детектирования только РНК HCV путем сравнения избранной последовательности с последовательностями, опубликованными в банках данных. В случае HCV праймеры (и зонды) обычно выбирают из областей 5'-некодируемого участка генома HCV, которые хорошо сохраняются для всех генотипов.

Амплифицированный продукт должен однозначно идентифицироваться одним из многих методов, например, проведением амплификации с вложенными праймерами, анализ с использованием ферментов рестрикции, секвенирование или гибридизация со специфическим зондом.

Для валидации специфичности аналитического метода испытание должно быть проведено в отношении не менее 100 РНК HCV-отрицательных пулов плазмы, для которых должно быть показано отсутствие реакции. Подходящие образцы пулов, не дающих реакции, могут быть получены в Европейском директорате по качеству медицинских препаратов.

Способность аналитического метода к детекции всех генотипов HCV также зависит от выбора праймеров, зондов и параметров метода. Эта способность должна быть продемонстрирована с использованием характеризованных эталонных панелей. Однако, ввиду сложности получения некоторых генотипов (например, генотипа 6), должны быть на подходящем уровне детектированы генотипы преобладающих типов (например, в Европе – генотипы 1 и 3).

3. ПРЕДЕЛ ДЕТЕКЦИИ

За предел детекции данной аналитической процедуры принимают наименьшее количество нуклеиновой кислоты в образце, которое может быть детектировано, но не обязательно определено как точное значение. Аналитический метод с использованием амплификации нуклеиновых кислот, используемый для детекции РНК HCV в пулах плазмы, обычно дает качественные результаты. Количество возможных результатов ограничено двумя: либо положительным, либо отрицательным. Хотя рекомендуется определение предела детекции, в практических целях для аналитического метода на основе амплификации нуклеиновых кислот должно быть определено положительное граничное значение. Положительное граничное значение (в соответствии с определением в общем разделе *2.6.21*) представляет собой минимальное количество последовательностей-мишеней в объеме образца, которые могут быть определены в 95% испытаний. На это положительное граничное значение оказывают влияние распределение вирусных геномов в индивидуальных испытуемых образцах и такие факторы, как эффективность фермента. Это может привести к получению различных 95% граничных значений для отдельных испытаний.

Для определения положительного граничного значения ряд разведений рабочего реагента или стандартного образца *вируса гепатита С BRP*, калиброванного в сравнении с Международным Стандартом HCV ВОЗ 96/790, должен быть подвергнут испытанию в разные дни для проверки изменчивости результатов

анализа. Для проведения статистического анализа результатов должно быть испытано не менее трех независимых рядов разведений в количестве повторностей для каждого из разведений, достаточном для получения всего 24 результатов испытания для каждого разведения.

Например, в лаборатории в разные дни могут быть проведены испытания трех рядов разведений в восьми повторностях для каждого из них, четырех рядов разведений в шести повторностях для каждого из них или шести рядов разведений в четырех повторностях для каждого из них. Для того, чтобы число разведений не было слишком большим, следует провести предварительное испытание (например, с использованием логарифмических разведений образца пула плазмы) с получением предварительного положительного граничного значения (т.е. наибольшего значения, дающего положительный результат). После этого диапазон разведений может быть выбран в области полученного предварительного значения (с использованием, например, логарифмического фактора разведения 0,5 или менее и отрицательного пула плазмы для матрицы разведения). Концентрация РНК HCV, которая может быть детектирована в 95% испытаний, может быть вычислена с использованием соответствующих методов статистической оценки.

Эти результаты также могут служить для демонстрации изменчивости результатов, получаемых данным аналитическим методом, в ходе испытания и в разные дни.

4. УСТОЙЧИВОСТЬ

Устойчивость аналитического метода – мера его способности выдерживать воздействие малых, но определенных изменений параметров метода, являющаяся показателем его надежности при обычном использовании.

Оценка надежности должна проводиться в фазе разработки. Она должна показать надежность аналитической процедуры с учетом определенных вариаций параметров метода. Для случая МАНК, небольшие изменения параметров метода могут иметь решающее значение. Однако, в ходе разработки метода его устойчивость может быть продемонстрирована небольшим изменением концентраций реагентов (например, $MgCl_2$, праймеров или dNTP). Для демонстрации устойчивости не менее 20 РНК HCV-отрицательных пулов плазмы, отобранных случайным образом и инфицированных РНК HCV с получением конечной концентрации, в три раза превышающей заранее определенное 95% граничное значение, должны быть испытаны и признаны положительными.

Проблемы с устойчивостью могут возникнуть также в связи с методами, в которых экстракции вирусной РНК предшествует стадия ультрацентрифугирования. Поэтому для испытания устойчивости таких методов не менее 20 пулов плазмы, содержащих различные уровни РНК HCV, но не содержащих специфических антител к HCV, должны быть испытаны и признаны положительными.

Предотвращение перекрестной контаминации должно быть продемонстрировано путем точной детекции панели из не менее 20 образцов, попеременно заполненной образцами отрицательных пулов плазмы и отрицательных пулов плазмы, инфицированных высокими концентрациями HCV (не менее 100-кратного 95% граничного значения или не менее 10^4 МЕ/мл).

5. ОБЕСПЕЧЕНИЕ КАЧЕСТВА

Для таких биологических испытаний, как МАНК, имеется вероятность возникновения специфических проблем, которые могут повлиять как на валидацию,

так и на интерпретацию результатов. Методики испытаний должны быть четко описаны в форме стандартных операционных процедур (СОП). В них должно указываться:

- способ отбора проб (тип контейнеров и т. д.),

- приготовление мини-пулов (по потребности),

- условия хранения до анализа,

- точное описание условий испытания, включая меры предосторожности против перекрестной контаминации и деструкции вирусной РНК, используемых реагентов и стандартных препаратов,

- точное описание используемой аппаратуры,

- детальные формулы для вычисления результатов, включая статистическую обработку.

В качестве удовлетворительной проверки соответствия системы и надежности аналитической процедуры, когда бы она ни использовалась, может быть рекомендован подходящий контроль процесса (например, подходящее разведение стандартного образца *вируса гепатита C BRP* или образец плазмы, инфицированной HCV, калиброванным в сравнении с Международным Стандартном HCV ВОЗ 96/790).

Техническая квалификация: каждой критической части используемого оборудования должна соответствовать программа квалификации по установке и эксплуатации. После замены критически важного оборудования (например, устройств для термоциркуляции) должна быть документально подтверждена производительность путем проведения параллельного испытания в отношении 8 повторных образцов пула плазмы, инфицированного РНК HCV с получением конечной концентрации, соответствующей предварительно определенному трехкратному 95% граничному значению. Все результаты должны быть положительными.

Квалификация оператора: в отношении каждого оператора, принимающего участие в испытании, должна действовать соответствующая квалификационная программа. Для подтверждения соответствующего уровня подготовки каждый оператор должен провести испытание не менее 8 повторяющихся образцов пула плазмы, инфицированного РНК HCV с получением конечной концентрации, соответствующей предварительно определенному трехкратному 95% граничному значению. Это испытание (8 повторяющихся образцов) должно быть повторено дважды, в два различных дня. Таким образом, должно быть проведено 24 испытания на протяжении трех дней. Все результаты должны быть положительными.

2.6.22. АКТИВИРОВАННЫЕ ФАКТОРЫ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ

При необходимости определяют количество присутствующего гепарина (*2.7.12*) и нейтрализуют его добавлением *протамина сульфата R* (10 мкг протамина сульфата нейтрализуют 1 МЕ гепарина). Готовят разбавления испытуемого препарата в соотношениях 1:10 и 1:100 с использованием *трис-(гидроксиметил)-аминометанового буферного раствора pH 7,5 R*. Ряд пробирок из полистирола помещают в водяную баню с температурой 37^{0}C и добавляют к каждой из пробирок по 0,1 мл *плазмы с пониженным содержанием тромбоцитов R* и по 0,1 мл подходящего разведения *цефалина R* или *заменителя тромбоцитов R*. Выдер-

живают в течение 60 секунд. К каждой пробирке добавляют либо 0,1 мл одного из разведений, либо 0,1 мл буферного раствора (контрольная пробирка). К содержимому каждой пробирки немедленно добавляют 0,1 мл предварительно нагретого до 37^{0}C раствора *кальция хлорида R* концентрацией 3,7 г/л и в течение 30 минут от момента первоначального разведения измеряют время между добавлением раствора хлорида кальция и формированием сгустка. Результаты считают достоверными, если время коагуляции в контрольной пробирке составило от 200 до 350 секунд.

2.7 Биологические методы количественного определения

2.7.1. ИММУНОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Иммунохимические методы основаны на селективном, обратимом нековалентном связывании антигенов антителами. Эти методы используются для обнаружения и количественного определения как антигенов, так и антител. Факт образования комплекса антигена с антителом и количество этого комплекса могут быть определены различными путями. Положения данного общего метода относятся к иммунохимическим методам с использованием меченых или немеченых реагентов.

Результаты, получаемые иммунохимическими методами, зависят от реакционных условий, а также природы и качества используемых реагентов. Важно стандартизировать компоненты, используемые в ходе иммуноанализа и, по возможности, использовать для количественных определений международные стандартные препараты.

Реагенты, необходимые для многих иммунохимических методов, содержатся в составе коммерчески доступных наборов, т.е. наборов, включающих реагенты (антигены или антитела) и материалы, предназначенные для оценки *in vitro* указанной субстанции, а также инструкции по их надлежащему применению. Наборы используются в соответствии с инструкциями производителя; важно убедиться в том, что наборы являются подходящими для анализа испытуемой субстанции с особым учетом их селективности и чувствительности.

МЕТОДЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕЧЕНОГО АНТИГЕНА ИЛИ АНТИТЕЛА

В методах с использованием меченых веществ могут применяться подходящие метки, например, ферменты, флуорофоры, люминофоры и радиоизотопы. Если меткой является радиоизотоп, метод называют «радиоиммунологическим анализом». Рекомендации по измерению радиоактивности, приведенные в статье «Радиофармацевтические препараты (0125)», подходят также и для иммунологических анализов с использованием радиоизотопов. Работа с радиоактивными материалами должна выполняться в соответствии с национальным законодательством и международными документами по защите от радиационной опасности.

МЕТОДЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НЕМЕЧЕНОГО АНТИГЕНА ИЛИ АНТИТЕЛА

Методы иммунопреципитации

Методы иммунопреципитации включают процессы флокуляции и осаждения. При смешивании растворов антигена с соответствующим антителом в подходящих условиях реактанты образуют флокулирующие или преципитационные агрегаты. Отношение реактантов, при котором достигается минимальное время флокуляции или наиболее заметное осаждение, называют оптимальным отношением. Такое отношение обычно составляют эквивалентные количества антигенов и антител. Иммунопреципитация может оцениваться визуально или по светорассеянию (нефелометрическое и турбидиметрическое определение). Увеличение чувствительности может быть достигнуто использованием в качестве реактантов частиц (например, из латекса), покрытых антигенами или антителами.

В методах флокуляции обычно используют ступенчатые разбавления одного из реактантов, в то время, как в иммунодиффузионных (ИД) методах разбавление достигается путем диффузии в гелеобразную среду: достигаются концентрационные градиенты одного из реактантов или обоих. Таким образом, в геле образуются зоны, в которых отношение реактантов способствует преципитации. В то время как флокуляционные методы выполняются в пробирках, в иммунодиффузионных методах используются различные носители: пробирки, пластины, стекла, ячейки или камеры.

Если система иммунопреципитации состоит из одного антигена в комбинации с соответствующим антителом, система определяется как *простая*; если в ней участвуют родственные, но серологически неидентичные реактанты, система является *сложной*, а если в ней участвуют несколько серологически не связанных друг с другом реактантов, ее называют *комплексной*.

В *методах простой диффузии* концентрационный градиент устанавливается только для одного из реактантов, диффундирующего из внешнего источника в гелевую среду, содержащую соответствующий реактант в относительно низкой концентрации.

Простая радиальная иммунодиффузия (ПРИД) представляет собой простой количественный иммуодиффузионный метод. При достижении равновесия между внешним и внутренним реактантами круговая область преципитации, начинающаяся от места локализации внешнего реактанта, прямо пропорциональна количеству нанесенного антигена и обратно пропорциональна концентрации антитела в геле.

В *двойных диффузионных методах* концентрационные градиенты устанавливаются для обоих реактантов. И антиген, и антитело диффундируют из различных участков в гель, который первоначально был иммунологически нейтральным.

Сравнительные методы двойной диффузии используются для количественного сравнения различных антигенов против подходящих антител или наоборот. Сравнение основано на наличии или отсутствии взаимодействия между образцами преципитации. Могут быть выделены реакции идентичности, неидентичности и частичной идентичности антигенов или антител.

Иммуноэлектрофоретические методы

Иммуноэлектрофорез (ИЭ) – качественный метод, сочетающий две процедуры: гель-электрофорез с последующей иммунодиффузией.

Перекрестный иммуноэлектрофорез представляет собой модификацию метода ИЭ и является подходящим как для качественного, так и для количественного анализа. Первая часть процедуры представляет собой обычный гель-электрофорез. По ее окончании протяженную полосу геля, содержащую разделенные фракции, подлежащие определению, вырезают и переносят на другую пластину. Электрофорез во втором направлении проводят перпендикулярно предыдущему электрофоретическому процессу в геле, содержащем относительно небольшую концентрацию антитела, соответствующего используемому антигену. Зависимость площади соответствующих пиков преципитации от количества соответствующего антигена является линейной для данной концентрации антитела и толщины геля.

Электроиммунный анализ, часто называемый *ракетным иммуноэлектрофорезом* представляет собой быстрый метод количественного определения антигенов с зарядом, отличным от заряда антител, и наоборот.

Выполняют электрофорез антигена, подлежащего определению, в геле, содержащем относительно низкую концентрацию соответствующих антител. Испытуемый материал и разведения стандартного антигена, используемые для калибровки, вносят в разные лунки в геле. В процессе электрофореза появляются мигрирующие пикообразные зоны преципитации, начинающиеся от лунок. Фронт преципитации становится неподвижным, когда количество антигена перестает быть избыточным. Зависимость расстояния, пройденного фронтом преципитации, от количества нанесенного антигена является линейной для данной концентрации антител.

Обратный иммуноэлектрофорез представляет собой быстрый метод количественного определения, позволяющий устанавливать концентрационные градиенты внешних антител и антигенов в электрическом поле в зависимости от разницы зарядов. Разведения стандарта для калибровки и разведения испытуемого материала вносят в ряд лунок в геле, а в противоположный ряд лунок вносят фиксированное количество соответствующего реактанта. Титр испытуемого материала может быть определен как максимальное разведение, для которого наблюдается линия преципитации.

Существует ряд модификаций методов перекрестного иммуноэлектрофореза и электроиммунного анализа.

В других методах сочетается разделение антигенов по размеру молекул и серологическим свойствам.

Визуализация и характеризация линий иммунопреципитации.

Эти операции могут быть выполнены с использованием селективных или неселективных красителей, по флуоресценции, введением ферментных или изотопных меток или другими подходящими методами. Для характеризации в преципитатах веществ небелковой природы обычно используют методы селективного окрашивания.

В полупрозрачных гелях, например, на основе агара или агарозы, линии осаждения четко различимы визуально при условии наличия достаточной концентрации каждого из реактантов.

ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДА

Критерии валидации

Количественный иммунохимический метод является достоверным при выполнении следующих условий:

1. Антитела и антигены не имеют существенных отличий в стандартном и испытуемом образце. В случае меченых реактантов, различия меченого и немеченого компонента соответствующего реактанта должны быть незначительными.
2. На результат не должна оказывать влияния матрица, т.е. любой компонент испытуемого образца или используемые вспомогательные вещества, которые могут отличаться в разных образцах. В образцах могут содержаться высокие концентрации посторонних белков, солей, консервантов или веществ, обладающих протеолитической активностью.
3. Предел количественного определения должен быть ниже критерия, установленного в частной статье.

4. Точность определения должна быть достаточной для выполнения требований, предъявляемых в частных статьях.
5. Порядок, в котором проводится определение, не приводит к увеличению системных ошибок.

Методы валидации

Для проверки выполнения этих критериев разрабатывается процесс валидации, включающий следующие элементы:

1. Испытание выполняют не менее чем в трех повторностях.
2. Испытание проводят не менее чем для трех различных разведений препарата сравнения и трех разведений испытуемых препаратов, предполагаемая активность которых равна активности стандартного образца.
3. Используют рандомизированную схему количественного определения.
4. Если испытуемый препарат находится в сыворотке или в смеси с иными компонентами, стандарт должен быть приготовлен аналогичным образом.
5. Испытание должно включать измерение неспецифического связывания меченого реактанта.
6. В случае заместительного иммунного анализа:

   а) определяют максимальное связывание (нулевое замещение),

   б) разведения должны охватывать весь диапазон откликов от значений, близких к неспецифическому связыванию, до максимального связывания, предпочтительно, как для стандартного, так и для испытуемого препарата.

СТАТИСТИЧЕСКИЕ ВЫЧИСЛЕНИЯ

Кривые откликов, полученные для испытуемого и стандартного препаратов, могут быть проанализированы с использованием методов, описанных в разделе *5.3. Статистический анализ результатов биологических испытаний и количественных определений*.

Существенная степень непараллельности указывает на то, что между антителом и антигеном в испытуемом и стандартном образцах имеются различия, и результаты испытания являются недостоверными.

В заместительных иммунологических количественных определениях не должно быть существенных различий между значениями неспецифического связывания и максимального замещения при высокой концентрации испытуемого образца и стандарта. Различия могут указывать на наличие эффектов, связанных с матрицей: ингибированием связывания либо разложением метки.

2.7.2. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИБИОТИКОВ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

Активность антибиотика определяют путем сравнения степени угнетения роста чувствительных микроорганизмов под действием испытуемого антибиотика и стандартного образца в известных концентрациях.

Стандартные образцы, используемые для количественного определения, представляют собой субстанции, активность которых точно установлена по отношению к международному стандарту.

Для количественного определения используют ФСО.

Определение должно выполняться способом, позволяющим производить проверку достоверности математической модели, на которой основан расчет активности. Если выбрана модель параллельных линий, линии логарифмической зависимости активности от дозы для испытуемого препарата и стандартного образца должны быть параллельны; они должны быть линейны в области доз, использовавшихся при вычислении. Эти условия должны быть проверены тестами соответствия для определенной вероятности, обычно $P = 0{,}05$.

Вычисления целесообразно проводить по схеме латинских квадратов (если при проведении анализа методом диффузии в агар были использованы прямоугольные кюветы) или по схеме рандомизированных блоков (если при проведении анализа методом диффузии в агар были использованы чашки Петри или анализ проводился турбидиметрическим методом).

Могут быть использованы и другие математические модели, например, модель отношения уклонов прямых, при условии доказательства их достоверности.

Если в частной статье не указано иное, доверительные интервалы ошибки количественного определения активности (P = 0,95) должны составлять от 95% до 105% от оцениваемой активности.

Определение выполняют методом А или методом В, если иное не указано в частной статье.

А. МЕТОД ДИФФУЗИИ

Питательную среду определенного состава расплавляют, засевают суспензией микроорганизмов, чувствительных к испытуемому антибиотику, при подходящей температуре, например, 48-50°С для вегетативных форм и 65-70°С при использовании суспензии спор. Количество суспензии микроорганизмов выбирают таким образом, чтобы образовывались четко определенные зоны ингибирования требуемого диаметра при концентрациях антибиотика, используемых в определении. Инокулированная среда разливается по чашкам Петри или по прямоугольным кюветам на строго горизонтальной поверхности в количестве, достаточном для формирования однородного слоя толщиной от 2 до 5 мм. Среда может также состоять из двух слоев, из которых только верхний подвергался инокуляции. Чашки хранят таким образом, чтобы не происходило заметного роста или гибели микроорганизмов до использования, а поверхность среды была сухой к моменту использования.

Используя растворитель и буферный раствор, указанный в Таблице 2.7.2.-1, готовят растворы стандартного образца и испытуемого антибиотика, имеющие известные концентрации и предположительно равные активности. Растворы наносят на поверхность среды, например, в стерильных цилиндрах из фарфора, нержавеющей стали или другого подходящего материала, или в лунках, сделанных в агаре. В каждый цилиндр или лунку должны быть помещены равные объемы раствора. Кроме того, можно использовать стерильные диски абсорбирующей бумаги подходящего качества; диски пропитывают растворами стандартного образца и растворами испытуемого антибиотика и помещают на поверхность агара.

Для оценки достоверности количественного определения используют не менее трех доз стандартного образца и трех доз испытуемого антибиотика, имеющих равные предполагаемые активности. Предпочтительно использовать ряды доз, меняющихся в геометрической прогрессии.

Например, в соотношении 1:2:4.

В рутинных анализах, когда линейность системы продемонстрирована в адекватном количестве экспериментов с определением по трем значениям, по согласованию с компетентными органами может считаться достаточным определение по двум значениям. Однако во всех спорных случаях должно применяться вышеописанное определение по трем значениям.

Растворы в каждой чашке Петри или прямоугольной кювете располагают статистически предпочтительным образом, кроме чашек Петри малого размера, на которых невозможно разместить больше шести растворов; растворы испытуемого антибиотика (U) и стандартного образца (S) чередуют таким образом, чтобы исключить взаимное влияние более концентрированных растворов.

Последовательность внесения стандартного и испытуемого образцов в цилиндры или лунки каждой чашки рекомендуется следующей: первыми вносятся растворы стандартного и испытуемого образца с малой концентрацией (S_1, U_1), затем со средней концентрацией (S_2, U_2), последними вносят растворы с большими концентрациями (S_3, U_3).

Все растворы стандартного испытуемого образцов вносят в цилиндры или лунки одной чашки Петри таким образом, чтобы растворы с большими концентрациями не соприкасались между собой. Предлагаемый вариант закапывания S_1 U_3 S_2 U_1 S_3 U_2.

Чашки инкубируют при подходящей температуре около 18 часов. Чашки могут выдерживаться до инкубации при комнатной температуре или, если необходимо, при 4 C^0 в течение определенного промежутка времени, обычно от 1 до 4 часов для протекания диффузии, что уменьшает эффекты вариаций временных интервалов между нанесением растворов и улучшает качество кривой регрессии.

Измеряют диаметры (с точностью не ниже 0,1 мм) или площади кольцевых зон ингибирования (с соответствующей точностью) и вычисляют активность с использованием подходящих статистических методов.

В каждом определении используют достаточное для получения требуемой точности количество повторов. Может быть проведено несколько определений, результаты которых статистически обработаны для получения требуемой точности и для подтверждения того, что активность испытуемого антибиотика не ниже минимальных требований.

Таблица 2.7.2.-1.

Количественное определение методом диффузии.

Антибиотик	**Стандартный образец**	**Растворитель, используемый для приготовления основного раствора**	**Буферный раствор (pH)**	**Микроорганизм**	**Среда и конечное значение pH (±0,1 ед. pH)**	**Температура инкубации, ^{0}C**
#**Азитромицин**	*Азитромицина ФСО*	Буфер №6, pH 6,0	Буфер №6, pH 6,0	*Bac.subtilis* ATCC 6633, *Bac.subtilis*, var. Л$_2$	№ 9 pH 7,8-8,0	35-37, 30-37
		1 мл этилового спирта на 10 мг навески, затем буфер № 4 до 1000 ЕД/мл	Буфер № 4, pH 7,8-8,0	*Bac.cereus* var.*mycoides* НВ	№ 9 pH 7,8-8,0	35-37
#**Ампициллин**	*Ампициллина тригидрата ФСО*	Буфер № 1, pH 6,8-7,0	Буфер № 1, pH 6,8-7,0	*Staphylococcus aureus* 209 P	№ 11, № 7+0,1% глюкозы,	35-39

					pH 6,8-7,0	
#Амфотерицин В	*Амфотерицина В ФСО*	Диметилсульфоксид	Буфер № 1 pH 6,8-7,0 (Срок годности р-ров при комнатной т-ре не более 30 мин)	*Candida utilis* ЛИА - 01	№ 16+0,1% глюкозы, pH 5,8-6,0	29-31
Бацитрацина цинковая соль	*Бацитрацина цинковой соли ФСО*	0,01 М хлористоводородная кислота	7,0 (0,05 М)	*Micrococcus luteus* NCTC 7743 CIP 53.160 ATCC 10240	A; 7.0	35-39
#Бензилпенициллин	*Бензилпенициллина натриевой соли ФСО*	Буфер № 1, pH 6,8-7,0	Буфер № 1, pH 6,8-7,0	*Staphylococcus aureus* 209 P	№ 11, № 7+0,1% глюкозы, pH 6,8-7,0	35-37
Блеомицина сульфат	*Блеомицина сульфата ФСО*	Дистиллированная вода	6,8 (0,1 М)	*Mycobacterium smegmatis* ATCC 607	G; 7.0	35-37
Ванкомицина гидрохлорид	*Ванкомицина гидрохлорида ФСО*	Дистиллированная вода	8,0	*Bacillus subtilis* NCTC 8236 ATCC 6633 CIP 52.62	A; 8.0	37-39
#Грамицидин С	*Грамицидина С ФСО*	Этиловый спирт 95%	Дистиллированная вода	*Bac.cereus* var.*mycoides* 537	№ 13, pH 7,0-7,2	35-37
Гентамицина сульфат	*Гентамицина сульфата ФСО*	Дистиллированная вода	8,0 (0,05 М)	*Bacillus pumilus* NCTC 8241 CIP 76.18 *Staphylococcus epidermidis* NCIMB 8853 CIP 68.21 ATCC 12228	A; 7.9 A; 7.9	35-39 35-39
#Гентамицин	*Гентамицина сульфата ФСО*	Буфер № 4, pH 7,8-8,0	Буфер № 4, pH 7,8-8,0	*Bac. pumilus* NCTC 8241	№ 9, pH 7,8-8,0	35-37
#Гелиомицин	*Гелиомицина ФСО*	0,1 М раствор едкого натра (1 мг основного в-ва в 5 мл раствора натра едкого)	0,1 М раствор едкого натра	*Bac.subtilis* ATCC 6633	№ 17, pH 7,8-8,0	35-37
Дигидрострептомицина сульфат	*Дигидрострептомицина сульфата ФСО*	Дистиллированная вода	8,0 (0,05 М)	*Bacillus subtilis* NCTC 8236 CIP 1.83 *Bacillus subtilis* NCTC 10400 CIP 52.62 ATCC 6633	A; 7.9 A; 7.9	30-37 30-37
#Дигидрострептомицин	*Дигидрострептомицина сульфата ФСО*	Буфер № 3 pH 6,0-6,2	Буфер № 4, pH 7.8-8,0	*Bac.cereus* var.*mycoides* 537	№ 9 pH 7,8-8,0	35-37
#Дактиномицин	*Дактиномицина ФСО*	Дистиллированная вода	Буфер № 4, pH 7,8-8,0	*Bac.cereus* var.*mycoides* НВ	№ 14 pH 7,8-8,0	35-37
#Диклоксациллин	*Диклоксациллина натриевой соли ФСО*	Буфер№ 1, pH 6,8-7,0	Буфер № 1, pH 6,8-7,0	*Staphylococcus aureus* 209 P	№ 11, № 7+0,1% глюкозы pH 6,8-7,0	35-37
#Доксициклин	*Доксициклина гидрохлорида ФСО*	0,01 М раствор хлористоводородной кислоты	Буфер № 2 pH 5,8-6,0	*Bac.subtilis*, var. $Л_2$	№ 6+1% глюкозы pH 6,8-7,0	35-37
Колистина сульфат Колистиметата натриевая соль	*Колистина сульфата ФСО Колистинметансульфоната натрия ФСО*	Дистиллированная вода	6,0 (0,05 М)	*Bordetella bronchiseptica* NCTC 8344 CIP 53.157 ATCC 4617 *Escherichia coli* NCIMB 8879	B; 7.3 B; 7.3	35-39 35-39

				CIP 54.127 ATCC 10536		
#Канамицин В	*Канамицина моносульфа-та ФСО*	Дистиллированная вода	Буфер № 4, pH 7,8-8,0	*Bac.subtilis* ATCC 6633	№ 12 pH 7,8-8,0, № 8 pH 7,8-8,0	35-37
#Карбени-циллин	*Карбени-циллина динатриевой соли ФСО*	Буфер № 1 pH 6,8-7,0	Буфер № 2 pH 5,8-6,0	*Pseudomonas aeruginosa* NCTC 2134	№ 7 pH 6,8-7,0	35-37
#Кармино-мицин	*Кармино-мицина гидрохлорида ФСО*	Дистиллированная вода	Буфер № 4, pH 7,8	*Bac.cereus* var.*mycoides* 537	№ 5 pH 7,8-8,0	35-37
Канамицина моносульфат Канамицина кислый сульфат	*Канамицина моносульфа-та ФСО*	Дистиллированная вода	8,0 (0,05 M)	*Bacillus subtilis* NCTC 10400 CIP 52.62 ATCC 6633 *Staphylococc us aureus* NCTC 7447 CIP 53.156 ATCC 6538 P	A; 7.9 A; 7.9	30-37 35-39
#Леворин	*Леворина ФСО*	Диметилсульфоксид	Диметилсульфоксид до концентрации 100 мкг/мл,а затем в буфере № 1 pH 6,8-7,0 (Срок годности растворов при комнатной температуре не более 30 мин)	*Candida utilis* ЛИА - 01	№16+1% Глюкозы pH 5,8-6,0	29-31
#Линкомицин	*Линкомицина гидрохлорида ФСО*	Дистиллированная вода	Буфер № 4, pH 7,8-8,0	*Bac.subtilis* ATCC 6633	№ 8 pH 7,8-8,0	35-37
#Мидекамицин	*Мидекамици-на ацетата ФСО*	Метиловый спирт до концентрации 500 мкг/мл, а затем буфер 7, pH 4,5	Метиловый спирт до концентрации 500 мкг/мл, а затем буфер 7, pH 4,5	*Bac.subtilis* ATCC 6633	№ 9, pH 7,8-8,0	35-37
#Метациклин	*Метацикли-на гидрохло-рида ФСО*	0,01 М раствор хлористоводородной кислоты	Буфер № 2 pH 5,8-6,0	*Bac.subtilis*, var. $Л_2$	№ 6+1% глюкозы pH 6,8-7,0	30-37
#Метициллин	*Метицилли-на натрие-вой соли ФСО*	Буфер № 1, pH 6,8-7,0	Буфер № 1, pH 6,8-7,0	*Staphylococcus aureus* 209	№ 11, №7+0,1% глюкозы pH 6,8-7,0	35-37
#Микогептин	*Микогепти-на ФСО*	Диметилсульфоксид	Диметилсульфоксид до 50 мкг/мл,а затем буфер № 4 pH 7,8-8,0 (Срок годности растворов при комнатной температуре не более 30 м)	*Candida utilis* ЛИА - 01	№16+1% глюкозы pH 5,8-6,0	29-31
#Мономицин	*Мономицина ФСО*	Дистиллированная вода	3 % раствор хлорида калия	*Bac.cereus* var.*mycoides* 537	№ 9 pH 7,8-8,0	35-37
#Неомицин	*Неомицина сульфата ФСО*	Буфер № 4, pH 7.8-8,0	Буфер № 4, pH 7,8-8,0	*Bac.cereus* var.*mycoides* 537	№ 9 pH 7,8-8,0	35-37
Неомицина сульфат	*Неомицина сульфата ФСО*	Дистиллированная вода	8,0 (0,05 M)	*Bacillus pumilus* NCTC 8241 CIP 76.18 *Bacillus subtilis* NCTC 10400 CIP 52.62 ATCC 6633	E; 7.9 E; 7.9	30-37 30-37

#Нистатин	*Нистатина ФСО*	Диметилформамид	Буфер № 3 рН 6,0-6,2	*Candida utilis* ЛИА - 01	№ 16+1% глюкозы рН 5,8-6,0	29-31
Нистатин	*Нистатина ФСО*	Диметилформамид	6,0 (0,05 М) при содержа-нии 5 об.% диметилформамида	*Saccharomyces cerevisiae* NCYC 87 CIP 1432-83 ATCC 9763	F; 6.0	30-32
#Оксациллин	*Оксациллина натриевой соли ФСО*	Буфер № 1, рН 6,8-7,0	Буфер № 1, рН 6,8-7,0	*Staphylococcus aureus* 209 Р	№ 11, № 7+0,1% глюкозы рН 6,8-7,0	35-37
#Окситетра-циклин	*Окситетра-циклина гидрохлорида ФСО*	0,01 М раствор хлористоводородной кислоты	Буфер № 2 рН 5,8-6,0	*Bac.subtilis*, var. Л$_2$	№ 6+1% глюкозы рН 6,8-7,0	30-37
#Олеандо-мицин	*Олеандо-мицина фос-фата ФСО*	Буфер № 3 рН 6,0-6,2	Буфер № 4, рН 7,8-8,0	*Bac.cereus* var.*mycoides* НВ	№ 9 рН 7,8-8,0	35-37
#Оливомицин	*Оливомицин-кислоты ФСО*	Стандартный образец в этиловом спирте из расчета 5 мг в1 мл, затем буфер № 1 рН 6,8-7,0	Буфер № 1, рН 6,8-7,0	*Bac.subtilis* АТСС 6633	№ 11, № 18 рН 6,8-7,0	35-37
#Полимиксин М	*Полимиксина М сульфата ФСО*	Буфер № 3 рН 6,0-6,2	Буфер № 5 рН 6,0-6,2	*Bordetella bronchiseptica* АТСС 4617	№ 15, рН 7,0-7,2	35-37
#Полимиксин В	*Полимиксина В сульфата ФСО*	Буфер № 3 рН 6,0-6,2	Буфер № 5 рН 6,0-6,2	*Bordetella bronchiseptica* АТСС 4617	№ 15 рН 7,0-7,2	35-37
Полимиксина В сульфат	*Полимиксина В сульфата ФСО*	Дистиллированная вода	6,0 (0,05 М)	*Bordetella bronchiseptica* NCTC 8344 CIP 53.157 ATCC 4617	B; 7.3	35-39
#Рифампицин	*Рифампицина ФСО*	1 мл диметилформамида на 10 мл навески, затем дистиллированная вода	Буфер № 3 рН 6,0-6,2	*Bac.subtilis* АТСС 6633	№ 10+0,1% глюкозы рН 6,0-6,2	35-37
Рифамицина натриевая соль	*Рифамицина натриевой соли ФСО*	Метанол	7,0 (0,05 М)	*Micrococcus flavus* NCTC 8340 CIP 53.45 ATCC 9341	A; 6.6	35-39
#Рубомицин	*Рубомицина гидрохлори-да ФСО*	Дистиллированная вода	Буфер № 4, рН 6,8-7,0	*Bac.cereus* var.*mycoides* 537	№ 5 рН 7,8-8,0	35-37
#Сизомицин	*Сизомицина сульфата ФСО*	Буфер № 4, рН 6,8-7,0	Буфер № 4, рН 6,8-7,0	*Bac. pumilus* NCTC 8241	№ 12, № 8 рН 7,8-8,0	35-37
#Стрепто-мицин	*Стрептоми-цина суль-фата ФСО*	Буфер №3 рН 6,0-6,2	Буфер № 4, рН 6,8-7,0	*Bac.cereus* var.*mycoides* 537	№ 9 рН 7,8-8,0	35-37
Стрепто-мицина сульфат	*Стрептоми-цина суль-фата ФСО*	Дистиллированная вода	8,0 (0,05 М)	*Bacillus subtilis* NCTC 8236, CIP 1.83. *Bacillus subtilis* NCTC 10400 CIP 52.62, ATCC 6633	A; 7.9 A; 7.9	30-37 30-37
Спирамицин	*Спирамицина ФСО*	Метанол	8,0 (0,05 М)	*Bacillus subtilis* NCTC 10400, CIP 52.62, ATCC 6633	A; 7.9	30-32
#Тетрациклин	*Тетрацикли-на гидро-*	0,01 М раствор хлористоводородной	Буфер № 2 рН 5,8-6,0	*Bac.subtilis*, var. Л$_2$	№ 6+1% глюкозы	35-37

	хлорида ФСО	кислоты			pH 6,8-7,0	
Тобрамицин	*Тобрамицина ФСО*	Дистиллированная вода	8,0 (0,05 М)	*Bacillus subtilis* NCTC 10400 CIP 52.62 ATCC 6633	A; 7.9	30-37
Фрамицетина сульфат	*Фрамицетина сульфата ФСО*	Дистиллированная вода	8,0 (0,05 М)	*Bacillus subtilis* NCTC 10400 CIP 52.62 ATCC 6633 *Bacillus pumilus* NCTC 8241 CIP 76.18	E; 7.9 E; 7.9	30-37 30-37
#Феноксиметилпенициллин	*Феноксиметилпенициллина ФСО*	Буфер № 1, pH 6,8-7,0	Буфер № 1, pH 6,8-7,0	*Staphylococcus aureus* 209 P	№ 11, № 7+0,1% глюкозы pH 6,8-7,0	35-37
#Флоримицин	*Флоримицина сульфата ФСО*	Дистиллированная вода	Буфер № 4, pH 7,8-8,0	*Bac.subtilis* ATCC 6633	№ 8 pH 7,8-8,0	35-37
#Фузидин	*Фузидиевой кислоты ФСО*	Стандартный образец – в этиловом спирте из расчета 10 мг/мл, затем буфер № 4; испытуемый образец – в буфере № 4, pH 7,8-8,0	Буфер № 3 pH 6,0-6,2	*Bac.cereus* var.*mycoides* HB	№ 10+1% глюкозы pH 6,0-6,2	35-37
#Цефалексин	*Цефалексина ФСО*	Буфер № 1, pH 6,8-7,0	Буфер № 1, pH 6,8-7,0	*Bac.subtilis* ATCC 6633	№ 11, № 7+0,1% глюкозы pH 6,8-7,0	35-37
#Цефалотин	*Цефалотина натриевая соль ФСО*	Буфер№ 1, pH 6,8-7,0	Буфер № 1, pH 6,8-7,0	*Bac.subtilis* ATCC 6633	№ 11, № 7+0,1% глюкозы pH 6,8-7,0	35-37
#Хлортетрациклин	*Хлортетрациклина гидрохлорида ФСО*	0,01 М раствор хлористоводородной кислоты	Буфер № 2	*Bac.subtilis*, var. $Л_2$	№ 6+1% глюкозы pH 6,8-7,0	35-37
#Эритромицин	*Эритромицина ФСО*	1 мл этилового спирта на 10 мг навески, затем буфер № 4 до 1000 ЕД/мл	Буфер № 4, pH 7,8-8,0	*Bac.cereus* var.*mycoides* HB	№ 9 pH 7,8-8,0	35-37
Эритромицина эстолат Эритромицина этилсукцинат Эритромицина стеарат	*Эритромицина ФСО*	Метанол (см. частные статьи) Метанол	8,0 (0,05 М)	*Bacillus pumil* NCTC 8241 CIP 76.18 *Bacillus subtilis* NCTC 10400 CIP 52.62 ATCC 6633	A; 7.9 A; 7.9	30-37 30-37

В. МЕТОД ТУРБИДИМЕТРИИ

Подходящую питательную среду с суспензией выбранного микроорганизма, обладающего чувствительностью к тестируемому антибиотику, инокулируют таким образом, чтобы в условиях определения происходило достаточно значительное ингибирование микробного роста. Количество суспензии выбирают таким образом, чтобы получить после четырех часов инкубации помутнение, легко подвергающееся количественной оценке.

Инокулированную среду используют немедленно после ее приготовления.

Используя растворитель и буферный раствор, указанные в Таблице 2.7.2.-2, готовят растворы стандартного образца и испытуемого антибиотика, имеющие

известные концентрации и предположительно равные активности. Для оценки достоверности количественного определения используют не менее трех доз стандартного образца и трех доз испытуемого антибиотика. Предпочтительно использовать ряды доз, меняющихся в геометрической прогрессии. Для получения необходимой линейности может оказаться необходимым осуществить выбор из большого количества трех последовательных доз, используя соответствующие дозы для стандартного образца и испытуемого антибиотика.

Помещают равные объемы каждого из растворов в идентичные пробирки и добавляют в каждую пробирку равные объемы инокулированной среды (например, 1 мл раствора и 9 мл среды).

Одновременно готовят две контрольные пробирки без антибиотика, содержащие инокулированную среду. В одну из них немедленно добавляют 0,5 мл формальдегида. Эти пробирки используют для настройки оптического прибора, используемого для измерения роста.

Все пробирки, распределенные случайным образом, методом латинского квадрата или рандомизированного блочного распределения, помещают в водяную баню или в другой подходящий аппарат, позволяющий быстро довести температуру всех пробирок до соответствующей температуры инкубации и поддерживать их при этой температуре в течение 3-4 часов, обеспечивая однородность температурного режима и равное время инкубации.

По окончании инкубации рост микроорганизмов останавливают добавлением 0,5 мл формальдегида в каждую пробирку или тепловой обработкой и измеряют степень мутности, используя подходящий оптический прибор. Можно использовать метод, позволяющий измерять степень мутности в каждой пробирке по окончании одинаковых периодов инкубации.

Измеряют активность с использованием подходящих статистических методов.

Линейность преобразованной или не преобразованной зависимости реакции от дозы часто получается лишь в ограниченном промежутке. Именно в этом промежутке необходимо производить вычисление активности. Для подтверждения линейности определение проводят на трех последовательных дозах из этого промежутка. В рутинных анализах по согласованию с компетентными органами определение может проводиться по двум значениям при условии, что линейность подтверждена адекватным количеством экспериментов с использованием трех значений. Однако, во всех спорных случаях должно применяться вышеописанное определение по трем значениям.

В каждом определении используют достаточное для получения требуемой точности количество репликаций. Определение может быть проведено повторно, и результаты статистически комбинированы для получения требуемой точности и для подтверждения того, что активность испытуемого антибиотика не менее минимальных требований.

Таблица 2.7.2.-2

Количественное определение методом турбидиметрическим методом.

Антибиотик	Стандартный образец	Растворитель, используемый для приготовления раствора	Буферный раствор (pH)	Микроорганизм	Среда и конечное значение pH (±0,1 ед. pH)	Температура инкубации, ^{0}C
Ванкомицина гидрохлорид	*Ванкомицина гидрохлорида ФСО*	Дистиллированная вода	8,0	*Staphylococcus aureus* ATCC 6538 P CIP 53.156	C; 8.0	37-39
Гентамицина сульфат	*Гентамицина сульфата ФСО*	Дистиллированная вода	7,0	*Staphylococcus aureus* NCTC 7447 CIP 53.156 ATCC 6538 P	C; 7.0	35-37
Грамицидин	*Грамицидина ФСО*	Метанол	7,0. Может оказаться необходимым добавление детергента для предотвращения адсорбции материала в ходе разведений, например, полисорбата 80 в концентрации 0,1 мг/мл	*Streptococcus faecalis* ATCC 10541 *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 P	C; 7.0	35-37
Дигидрострептомицина сульфат	*Дигидрострептомицина ФСО*	Дистиллированная вода	8,0	*Klebsiella pneumoniae* NCTC 7427 CIP 53.153 ATCC 10031	C; 7.0	35-37
Канамицина моносульфат Канамицина кислый сульфат	*Канамицина сульфата ФСО*	Дистиллированная вода	8,0	*Staphylococcus aureus* NCTC 7447 CIP 53.156 ATCC 6538 P	C; 7.0	35-37
Колистина сульфат Колистиметата натриевая соль	*Колистина сульфата ФСО Колистинметансульфоната натрия ФСО*	Дистиллированная вода	7,0	*Escherichia coli* NCIMB 8666 CIP 2.83 ATCC 9637	C; 7.0	35-37
Неомицина сульфат	*Неомицина сульфата ФСО*	Дистиллированная вода	8,0	*Staphylococcus aureus* NCTC 7447 CIP 53.156 ATCC 6538 P	C; 7.0	35-37
Рифамицина натриевая соль	*Рифамицина натриевой соли ФСО*	Метанол	7,0	*Escherichia coli* NCIMB 8879 CIP 54.127 ATCC 10536	C; 7.0	35-37
Спирамицин	*Спирамицина ФСО*	Метанол	7,0	*Staphylococcus aureus* NCTC 7447 CIP 53.156 ATCC 6538 P	C; 7.0	35-37
Стрептомицина сульфат	*Стрептомицина сульфата ФСО*	Дистиллированная вода	8,0	*Klebsiella pneumoniae* NCTC 7427 CIP 53.153 ATCC 10031	C; 7.0	35-37
Тобрамицин	*Тобрамицина ФСО*	Дистиллированная вода	7,0	*Staphylococcus aureus* NCTC 7447	C; 7.0	35-37

				ATCC 6538 P CIP 53.136 ATCC 9144		
Фрамицетина сульфат	*Фрамицетина сульфата ФСО*	Дистиллированная вода	8,0	*Staphylococcus aureus* NCTC 7447 CIP 53.156 ATCC 6538 P	C; 7.0	35-37
Эритромицина эстолат Эритромицина этилсукцинат Эритромицина стеарат	*Эритромици-на ФСО*	Метанол (см. частные статьи)	8,0	*Klebsiella pneumoniae* NCTC 7427 CIP 53.153 ATCC 10031	D; 7.0	35-37
		Метанол		*Staphylococcus aureus* NCTC 7447 CIP 53.156 ATCC 6538 P	C; 7.0	35-37

Следующий раздел дается для информационных и методических целей; он не является обязательной частью общего метода.

РЕКОМЕНДУЕМЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ

В нижеследующем тексте приводятся рекомендуемые микроорганизмы и условия их применения. Могут также использоваться и другие микроорганизмы при условии, что показана их чувствительность к испытуемому антибиотику и они могут использоваться в подходящей среде и при подходящих значениях температуры и pH. Концентрации используемых растворов должны быть выбраны таким образом, чтобы в условиях испытания обеспечивалось наличие линейной зависимости между логарифмом дозы и реакцией.

Приготовление посевного материала:

Bacillus cereus var. *mycoides; Bacillus subtilis; Bacillus pumilus.* Суспензия спор микроорганизмов, используемая в качестве посевного материала, готовится следующим образом.

Микроорганизм выращивается при 35-37°С в течение 7 дней на поверхности подходящей среды, к которой добавлен сульфат марганца (II) в концентрации 0,001 г/л. Выращенную культуру, состоящую в основном из спор, смывают стерильной водой. Нагревают суспензию при 70 °С 30 минут и разбавляют для получения подходящей концентрации спор, обычно от 10×10^6 до 100×10^6 в мл. Суспензия спор может храниться в течение продолжительного времени при температуре, не превышающей 4°С.

Суспензия спор также может быть приготовлена путем культивирования организмов в среде С при 26°С в течение 4-6 дней с последующим добавлением в асептических условиях сульфата марганца в количестве, достаточном для получения концентрации 0,001 г/л и инкубированием в течение 48 часов. Суспензию микроскопируют для подтверждения спорообразования (около 80%) и центрифугируют. Осадок ресуспендируют в стерильной воде, получая концентрацию спор от 10×10^6 до 100×10^6 в миллилитре, после чего нагревают при 70°С в течение 30 минут. Суспензию хранят при температуре, не превышающей 4°С.

Bordetella bronchiseptica. Микрорганизм выращивают на среде В при 35-37°С в течение 16-18 ч. Выращенную культуру смывают стерильной водой и разбавляют до требуемой степени мутности.

Staphylococcus aureus; Klebsiella pneumoniae; Escherichia coli; Micrococcus flavus; Staphylococcus epidermidis. Посевной материал готовят по методу, описанному выше для *B. bronchiseptica,* но с использованием среды A и доведением степени мутности до значения, дающего, в зависимости от метода, удовлетворительную зависимость реакции от дозы в турбидиметрическом определении или четкие зоны ингибирования подходящего диаметра.

Saccharomyces cerevisiae; Candida tropicalis. Тест-культуры выращивают на среде F при 30-37°C 24 часа. Смывают выращенную культуру стерильным раствором натрия хлорида с концентрацией 9 г/л. Разбавляют до требуемой степени мутности тем же раствором.

Допустимо использование следующих методов приготовления посевного материала:

Candida utilis ЛИА-01

Выращивают в пробирках со скошенной средой № 3 в течение 48 часов при температуре (30 ± 1)°C.

Staphylococcus aureus

Выращивают в пробирках со скошенной средой № 1 в течение 24 часов при температуре (36 ± 1)°C.

Bordetella bronchiseptica

Выращивают в пробирках со скошенной средой № 1. Продолжительность инкубации 30-36 часов при температуре (36 ± 1)°C.

Pseudomonas aeruginosa NCTC 2134

Выращивают на мясо-пептонном бульоне pH 7,2-7,4 при температуре (36 ± 1)°C в течение 18-20 часов.

Bacillus pumilus, NCTC 8241, Bacillus subtilis ATCC 6633, Bacillus cereus var.mycoides HB, Bacillus cereus var.mycoides 537

Для получения суспензии спор тест-микроорганизмы выращивают на скошенной среде в пробирках (среда № 1 для *B. subtilis* var.L_2, *B.pumilus* NCTC8241, *B. subtilis* ATCC 6633, *B.cereus* var.*mycoides* HB; среда № 2 для *B.cereus* var.*mycoides* 537), при температуре (36 ± 1)°C 18-20 часов. Культуру, выращенную в пробирках, смывают 5-10 мл стерильного раствора натрия хлорида 0,9 %, засевают ею несколько матрацев с 300 мл питательной среды со скошенной поверхностью, (среда № 4 для *B.pumilus*, *B. cereus* var.*mycoides* 537; среда № 5 для *B. subtilis* ATCC 6633, *B.cereus* var.*mycoides* HB). На матрацах посевы инкубируют при температуре (36 ± 1)°C в течение 5-7 суток. В процессе выращивания проводят микроскопический контроль культуры. Культуру, содержащую 80-90 % спор, смывают стерильной дистиллированной водой.

Полученную взвесь спор прогревают при температуре от 60 до 70°C в течение 30 минут. Затем промывают стерильной дистиллированной водой при центрифугировании до полной прозрачности надосадочной жидкости. Промытую взвесь спор вновь прогревают в течение 30 минут при температуре от 60 до 70°C. Взвесь спор хранят при температуре от 4 до 10°C и используют до тех пор, пока

интенсивность роста и четкость зон при определении антимикробной активности препаратов удовлетворяют предъявляемым требованиям.

Таблица 2.7.2 - 3

Характеристики культуральных свойств тест-микроорганизмов.

Название тест-микроба	**При росте на плотной питательной среде**		**При росте на жидкой питательной среде**		**При микроскопическом изучении мазка агаровой культуры, окрашенной по Граму**
	условия выращивания	**описание культуры**	**условия выращивания**	**описание культуры**	
Staphylococcus aureus 209 P	Среда № 1. T^0 (36±1)°C, 18-20 ч. затем при комнатной температуре 24 ч	Гладкие с ровными краями колонии, с равномерной золотистой пигментацией	Мясо-пептонный бульон. pH 7,2—7,4, 18—20 ч	Равномереное помутнение бульона без пленки и слизистого осадка на дне	Однородные по величине и расположению в виде гроздьев кокки с хорошо выраженной грамположительной окраской
Candida utilis ЛИА-01	Среда № 3. T^0 (30±1) °C. 48 ч	Круглые кремового цвета с матовой поверхностью колонии с ровными краями	МПБ. pH 7,2-7.4 с 1 % глюкозой. 18—20 ч	Рост в виде равномерной мути и осадка на дне	Овальные иногда с отростками клетки: расположены отдельно, цепочками или группами
Bacillus subtilis. var. $Л_2$	Среда №1. T^0 (36±1) ^{0}C. 18—20ч	Колонии желтоватого цвета, круглой формы влажно блестящие с шагреневой поверхностью, слегка зазубренными краями и приподнятым центром	МПБ. pH 7.2—7,4 18—20 ч	Рост в виде пленки с осадком на дне	Палочки с закругленными краями, располагающиеся отдельно и цепочками с хорошо выраженной грамположительной окраской
Bacillus subtilis ATCC 6633	Среда № 1. T^0 (36±1) °C 18—20 ч	Мелкие сероватые колонии с зубчатым краем	МПБ. pH 6.8—7.0. 18—20 ч	Рост в виде пленки с осадком на дне	Тонкие палочки располагающиеся отдельно или цепочками, с хорошо выраженной грамположительной окраской
Bacillus cereus. var. *mycoides* 537	Среда № 2 T^0 (36±1) ^{0}C. 18—20 ч.	Шероховатые колонии с краем, сформированным из переплетающихся волокон	МПБ. pH 7.8—8.0. 18—20 ч	Морщинистая пленка: вся среда прозрачная без осадков	Палочки с закругленными концами, располагающимися отдельно или цепочками, с хорошо выраженной грамположительной окраской
Bacillus cereus. var. *mycoides* HB	Среда №1. T° (36±1)^{0}C. 18—20 ч	Гладкие колонии с ровными краями и сферической поверхностью	МПБ. pH 6.8-7,0, 18—20 ч	Равномерное помутнение бульона без образования пленки и осадка	Тонкие с закругленными концами палочки располагающиеся отдельно или короткими цепочками с хорошо выраженной грамположительно окраской
Bacillus pumilus NCTC 8241	Среда № 1. T^0 (36±1)°C. 18—20 ч	Мелкие серовато-голубого цвета колонии с зазубренными краями и приподнятым центром	МПБ. pH. 7.2—7.4. 18—20 ч	Равномерное помутнение бульона без образования пленки и осадка	Тонкие, мелкие палочки с закругленными концами, располагающиеся отдельно или короткими цепочками, с хорошо выраженной грамположительной окраской

Bordetella bronchiseptica ATCC 4617	МПА. pH 7.2—7.4 T^0 (36-±1) ^{0}C. 18—20 ч	Мелкие, мутные, белые слегка выпуклые фарфоровидные колонии	МПБ. pH 7.2—7.4	Заметное помутнение, серая пленка, тягучий осадок	Одиночные, короткие, тонкие палочки с хорошо выраженной грамотрицательной окраской
Pseudomonas aeruginosa NCTC 2134	МПА. pH 7.2—7.4. T^0 (36±1) ^{0}C. 18—20 ч	Широкие расплывчатые прозрачные с неровным краем колонии	МПБ. pH 7.2—7.4	Заметное помутнение, толстая пленка, среда может приобретать желтовато-зеленую окраску	Одиночные палочки, либо короткие цепочки с хорошо выраженной грамотрицательной окраской

Буферные растворы. Буферные растворы с показателем pH в интервале от 5,8 до 8,0 готовят смешиванием 50,0 мл 0,2 М раствора калия фосфата однозамещенного с указанным в Таблице 2.7.2.-4 объемом 0,2 М раствора натрия гидроксида. Разбавляют свежеприготовленной дистиллированной водой до 200,0 мл.

Таблица 2.7.2.-4

Буферные растворы

pH	Объем 0,2 М раствора натрия гидроксида, мл	pH	Объем 0,2 М раствора натрия гидроксида, мл
5,8	3,72	7,0	29,63
6,0	5,70	7,2	35,00
6,2	8,60	7,4	39,50
6,4	12,60	7,6	42,80
6,6	17,80	7,8	45,20
6,8	23,65	8,0	46,80

Эти буферные растворы используются для всех микробиологических определений, указанных в Таблице 2.7.2.-1, за исключением блеомицина сульфата и амфотерицина В.

Буферный раствор (pH 6,8) для блеомицина сульфата готовят растворением 6,4 г калия фосфата однозамещенного и 18,9 г натрия фосфата двузамещенного в воде и доведением объема до 1000 мл.

Допускается также применение буферных растворов следующего состава:

Буфер № 1

Состав:

Калия фосфат однозамещенный	3,63 г
Натрия фосфат двузамещенный	7,13 г
Вода дистиллированная	до 1000 мл
pH буфера	6,9±0,1

Буфер № 2

Состав:

Натрия цитрат трехзамещенный	20,6 г
Кислота хлористоводородная концентрированная	1,81 г
Вода дистиллированная	до 1000 мл
pH буфера	5,9±0,1

Буфер № 3

Состав:

Калия фосфат однозамещенный	7,72 г
Натрия фосфат двузамещенный	1,78 г

Вода дистиллированная	до 1000 мл
pH буфера	6,1±0,1

Буфер № 4
Состав:

Калия фосфат однозамещенный	0,68 г
Натрия фосфат двузамещенный	10,99 г
Вода дистиллированная	до 1000 мл
pH буфера	7,9±0,16

Буфер № 5
Состав:

Калия фосфат однозамещенный	32 г
Натрия фосфат двузамещенный	8 г
Вода дистиллированная	до 1000 мл
pH буфера	6,1 ±0,1

Буфер № 6
Состав:

Натрия фосфат двузамещенный	35,8 г
Вода дистиллированная	до 1000 мл
pH буфера	6,0

Буфер № 7
Состав:

Натрия фосфат однозамещенный	0,64 г
Натрия фосфат двузамещенный	0,195 г
Вода дистиллированная	до 1000 мл
pH буфера	4,5

Буферные растворы стерилизуют насыщенным паром под давлением при 121°С 15 минут.

Питательные среды. Могут быть использованы следующие или эквивалентные питательные среды.

Среда А.

Пептон	6г
Панкреатический гидролизат казеина	4г
Мясной экстракт	1,5 г
Дрожжевой экстракт	3 г
Глюкозы моногидрат	1 г
Агар	15 г
Вода	до 1000 мл

Среда В

Панкреатический гидролизат казеина	17 г
Папаиновый гидролизат соевых бобов	3 г
Натрия хлорид	5 г
Калия фосфат двузамещенный	2,5 г
Глюкозы моногидрат	2,5 г
Агар	15 г
Полисорбат 80	10 г
Вода	до 1000 мл

Полисорбат 80 добавляется к горячему раствору остальных ингредиентов после кипячения, непосредственно перед доведением объема.

Среда С.

Пептон	6г
Мясной экстракт	1,5 г
Дрожжевой экстракт	3 г
Натрия хлорид	3,5 г
Глюкозы моногидрат	1 г
Калия фосфат двузамещенный	3,68 г
Калия фосфат однозамещенный	1,32 г
Вода	до 1000 мл

Среда D.

Экстракт сердца	1,5 г
Дрожжевой экстракт	1,5 г
Пептон-казеин	5 г
Глюкозы моногидрат	1 г
Натрия хлорид	3,5 г
Калия фосфат двузамещенный	3,68 г
Калия фосфат однозамещенный	1,32 г
Калия нитрат	2 г
Вода	до 1000 мл

Среда Е.

Пептон	5 г
Мясной экстракт	3 г
Натрия фосфат двузамещенный двенадцативодный	26,9 г
Агар	10 г
Вода	до 1000 мл

Натрия фосфат двузамещенный добавляется в виде стерильного раствора после стерилизации среды.

Среда F.

Пептон	9,4 г
Дрожжевой экстракт	4,7 г
Мясной экстракт	2,4 г
Натрия хлорид	30,0 г
Глюкозы моногидрат	10,0 г
Агар	23,5 г
Вода	до 1000 мл

Среда G.

Глицерин	10 г
Пептон	10 г
Мясной экстракт	10 г
Натрия хлорид	3 г
Агар	15 г
Вода	до 1000 мл

рН 7,0+0,1 после стерилизации

#

Среда № 1

Состав:

Мясо-пептонный бульон	1000 мл
Агар-агар	20 г
pH после стерилизации	7,1 ±0,1

Среда № 2

Состав:

Мясо-пептонный бульон	1000 мл
Агар-агар	20 г
pH после стерилизации	7,9 ±0,1

Среда № 3

Состав:

Мясо-пептонный бульон	1000 мл
Агар-агар	17 г
Глюкоза	10 г
Натрия хлорид	5г
pH после стерилизации	7,1±0,1

Среда № 4

Состав:

Раствор гидролизата мяса по Хоттингеру с содержанием аминного азота 35-40% мг %	1000 мл
Агар-агар	25 г
pH после стерилизации	6,1±0,1

Среда № 5

Состав:

Раствор гидролизата мяса по Хоттингеру с содержанием аминного азота 35-40% мг %	1000 мл
Агар-агар	25 г
pH после стерилизации	7,9±0,1

Среда № 6

Состав:

Раствор гидролизата мяса по Хоттингеру с содержанием аминного азота 130-140% мг %	1000 мл
Агар-агар	10 - 15 г
pH после стерилизации	6,9±0,1

Среда № 7

Состав:

Раствор гидролизата мяса по Хоттингеру с содержанием аминного азота 130-140% мг %	1000 мл
Агар-агар	10-12 г
Натрия фосфат двузамещенный	3 г
pH после стерилизации	6,9±0,1

Среда № 8

Состав:

Раствор гидролизата мяса по Хоттингеру с содержанием аминного азота 130-140% мг %	1000 мл
Агар-агар	10-12 г
Натрия фосфат двузамещенный	3 г
pH после стерилизации	7,9±0,1

Среда № 9
Состав:

Раствор гидролизата мяса по Хоттингеру с содержанием аминного азота 35-40% мг %	1000 мл
Натрия фосфат двузамещенный	3 г
pH после стерилизации	7,9±0,1

Среда № 10
Состав:

Раствор гидролизата мяса по Хоттингеру с содержанием аминного азота 130-140% мг %	1000 мл
Агар-агар	10-15 г
Калия фосфат однозамещенный	25 г
pH после стерилизации	6,1 ±0,1

Среда № 11
Состав:

Агар-агар	10-15 г
Натрия фосфат двузамещенный	3 г
Вода дистиллированная	до 1000 мл
pH после стерилизации	6,9 ±0,1

Среда № 12
Состав:

Агар-агар	15 г
Натрия фосфат двузамещенный	3 г
Вода дистиллированная	до 1000 мл
pH после стерилизации	7,9±1

Среда № 13
Состав:

Раствор гидролизата мяса по Хоттингеру с содержанием аминного азота 35-40% мг %	1000 мл
Агар-агар	20 г
Калия хлорид	20 г
pH после стерилизации	7,1± 1

Среда № 14
Состав:

Раствор гидролизата мяса по Хоттингеру с содержанием аминного азота 35-40% мг %	1000 мл
Агар-агар	15 г
pH после стерилизации	7,9± 1

Среда № 15
Состав:

Раствор гидролизата мяса по Хоттингеру с содержанием аминного азота 35-40% мг %	1000 мл
Агар-агар	15г
Калия фосфат однозамещенный	25 г
pH после стерилизации	7,1±,0,1

Среда № 16
Состав:

Агар-агар	18-20 г
Натрия фосфат двузамещенный	5г

Натрия хлорид	20
Аммония цитрат двузамещенный	5 г
Калия хлорид	20 г
Вода дистиллированная	до 1000 мл
pH после стерилизации	5,9±,0,1

Среда № 17

Состав:

Агар-агар	18 г
Глюкоза	5 г
Натрия фосфат двузамещенный	15 г
Мочевина	2г
Аммония хлорид	2г
Вода дистиллированная	до 1000 мл
pH после стерилизации	7,9±1

Среда № 18

Состав:

Раствор гидролизата мяса по Хоттингеру с содержанием аминного азота 130-140% мг %	1000 мл
Агар-агар	15-20 г
Глюкоза	5 г
Натрия хлорид	30 г
pH после стерилизации	6,9±1

Среды стерилизуют насыщенным паром под давлением при 121°С 15 минут.

При приготовлении питательных сред вместо раствора гидролизата мяса по Хоттингеру можно использовать питательные среды на основе рыбного или мясо-пептонного бульона с таким же содержанием аминного азота

Среды стерилизуют в паровом стерилизаторе при температуре 121 °С в течение 15 минут.

2.7.3. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОРТИКОТРОПИНА

Активность кортикотропина определяют путем сравнения одного или нескольких из его биологических эффектов с аналогичными эффектами Международного Стандарта или препарата сравнения, калиброванного в Международных Единицах при проведении экспериментов в аналогичных условиях.

За Международную Единицу принимают активность установленного количества Международного Стандарта, состоящего из высушенного из замороженного состояния очищенного свиного кортикотропина с добавлением лактозы. Эквивалентность Международного Стандарта в Международных Единицах устанавливается Всемирной организацией здравоохранения.

Стандартный образец *кортикотропин BRP* калиброван в Международных Единицах в сравнении с Международным Стандартом.

В испытании используют крыс обоего пола массой тела от 100 до 200 г. Разница в массе тела у самого тяжелого и самого легкого животного должна составлять не более 15 г. Крыс содержат в однородных условиях в течение не менее 7 дней до начала испытания. В день, предшествующий испытанию, крыс взвешивают и проводят гипофизэктомию. После операции крысам обеспечивают доступ к раствору *глюкозы R* концентрацией 50 г/л и раствору *натрия хлорида R*

концентрацией 1,8 г/л в дополнение к обычной диете и воде и содержат крыс в помещении с постоянной температурой от 24 до 27^{0}С. Испытание выполняют через 18–36 часов после гипофизэктомии.

В день испытания повторно взвешивают животных и делят их случайным образом на 6 групп, каждая из которых состоит из 6–8 особей. Выбирают три дозы препарата сравнения и три дозы испытуемого препарата таким образом, чтобы наименьшая доза приводила к некоторому уменьшению, а наибольшая доза не приводила к максимальному уменьшению содержания аскорбиновой кислоты в надпочечниках. Дозы, отрегулированные с учетом массы тела животных, вводят подкожно в случайном порядке. Подходящими обычно являются дозы порядка 1,0, 0,5 и 0,25 МЕ на 100 г массы тела. Если в частной статье нет иных указаний, стандартный и испытуемый препараты растворяют в *0,01 М хлористоводородной кислоте* и выполняют последовательные разведения *водой R*, содержащей *желатин R* в концентрации 150 г/л. Растворы вводят в течение 4 часов после приготовления.

Через 3 часа после инъекции у анестезированной крысы удаляют обе надпочечные железы, освобождают их от посторонних тканей и по возможности быстро взвешивают для предотвращения потери массы. Крысу умерщвляют и исследуют на предмет полноты гипофизэктомии.

Пару надпочечников измельчают и гомогенизируют в свежеприготовленном растворе *метафосфорной кислоты R* концентрацией 25 г/л и разбавляют тем же раствором до 10 мл. Гомогенат выдерживают в течение 30 минут, после чего центрифугируют. 7 мл прозрачного супернатанта добавляют к свежеприготовленной смеси, состоящей из 7 мл раствора *натрия ацетата R* концентрацией 45,3 г/л со значением pH, доведенным до 7 путем добавления *уксусной кислоты R*, 3 мл *воды R* и 2 мл *стандартного раствора дихлорфенолиндофенола R*. Через 30 секунд после смешивания измеряют светопоглощение с помощью колориметра, используя фильтр с максимумом пропускания при 470 нм, в диапазоне пропускания от 450 до 520 нм. Содержание аскорбиновой кислоты вычисляют из стандартной кривой, которую получают аналогичной обработкой подходящих объемов свежеприготовленного раствора *аскорбиновой кислоты R* в растворе *метафосфорной кислоты R* концентрацией 25 г/л. Результаты выражают в миллиграммах на 100 г надпочечной железы. Результат количественного определения получают с использованием обычных статистических методов.

2.7.4. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФАКТОРА СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ VIII

Количественное определение фактора свертывания крови VIII производят по его биологической активности в качестве кофактора активации фактора X активированным фактором IX (фактором IXa) в присутствии ионов кальция и фосфолипидов. Активность препарата фактора VIII оценивают путем сравнения количества, необходимого для достижения определенной скорости образования фактора Xa в испытуемой смеси, содержащей вещества, принимающие участие в активации фактора X, и количества Международного Стандарта или препарата сравнения, калиброванного в Международных Единицах, которое требуется для получения такой же скорости образования фактора Xa.

За Международную Единицу принимают активность фактора VIII в установленном количестве Международного Стандарта, состоящего из высушенного из замороженного состояния концентрата человеческого фактора свертывания крови

VIII. Эквивалентность Международного Стандарта в Международных Единицах устанавливается Всемирной организацией здравоохранения.

Стандартный образец *человеческий фактор свертывания крови VIII BRP* калиброван в Международных Единицах в сравнении с Международным Стандартом.

Хромогенный метод количественного определения включает две последовательные стадии: зависящая от фактора VIII активация фактора X в реагенте факторов свертывания, состоящем из очищенных компонентов, и ферментативное расщепление хромогенного субстрата фактором Xa с образованием хромофора, который определяют спектрофотометрически. В соответствующих условиях испытания существует линейная зависимость между скоростью образования фактора Xa и концентрацией фактора VIII. Содержание метода количественного определения описывается следующей схемой:

1-я стадия Фактор X $\xrightarrow[\text{Фактор IXa, фосфолипид, } Ca^{2+}]{\text{(активированный) фактор VIII}}$ Фактор Xa

2-я стадия хромогенный субстрат $\xrightarrow{\text{Фактор Xa}}$ пептид + хромофор

В обеих стадиях используются реагенты, доступные из ряда коммерческих источников. Хотя в состав реагентов могут вноситься некоторые изменения, их основные свойства должны соответствовать нижеприведенным спецификациям. Отклонения от этого описания допустимы при условии, что с использованием в качестве препарата сравнения Международного Стандарта концентрата человеческого фактора свертывания крови VIII показано отсутствие существенных различий в результатах.

Коммерчески доступные наборы для количественного определения следует использовать в соответствии с инструкциями изготовителя; важно убедиться в том, что используемый набор подходит для данного количественного определения.

РЕАГЕНТЫ

Реагент факторов коагуляции состоит из очищенных белков человеческого или говяжьего происхождения, включающих фактор X, фактор IXa и активатор фактора VIII, обычно тромбин. Эти белки подвергнуты частичной очистке, предпочтительно, не менее чем до 50%, и не должны содержать примесей, мешающих активации фактора VIII или фактора X. Фактор X содержится в количествах, приводящих к конечной концентрации на первой стадии определения, находящейся в пределах 10–350 нмоль/л, предпочтительно 15–30 нмоль/л. Фактор IXa готовят активацией очищенного фактора IX с использованием фактора XIa и получением фактора IXaβ и дальнейшей очисткой фактора IXaβ из реакционной смеси. Его окончательная концентрация в процессе образования фактора Xa должна составлять менее 30% от концентрации фактора X, обычно 1–100 нмоль/л, предпочтительно 1–10 нмоль/л. Тромбин может присутствовать в форме его предшественника – протромбина, при условии, что его активация в реагенте протекает с достаточной скоростью для практически мгновенной и полной активации в эксперименте фактора VIII. Фосфолипиды могут быть получены из природных источников, например, из головного или спинного мозга крупного рогатого скота, соевого экстракта или синтетическим путем, и должны состоять в существенной степени (обычно от 15 до 35%) из фосфатидилсеринов. Окончательная

концентрация фосфолипида в процессе образования фактора Ха должна составлять 1–50 мкмоль/л, предпочтительно 10–35 мкмоль/л. Реагент содержит ионы кальция в количестве, приводящем к окончательной концентрации 5-15 ммоль/л. Образование конечного фактора Ха проводят в растворе, содержащем не менее 1 мг/мл человеческого или бычьего альбумина, соответствующим образом буферизированного до pH 7,3–8,0. Компоненты реагента обычно разделяют не менее чем на два отдельных реагента, каждый из которых не обладает способностью самостоятельно генерировать фактор Ха. После восстановления реагенты могут быть объединены при условии, что в отсутствии фактора VIII не происходит образования существенных количеств фактора Ха. В окончательной инкубационной смеси фактор VIII должен быть единственным компонентом, лимитирующим скорость.

Вторая стадия включает количественное определение образовавшегося фактора Ха с использованием специфичного в отношении фактора Ха хромогенного субстрата. Обычно он представляет собой производное короткого пептида, состоящего из 3–5 аминокислотных остатков, соединенное с хромофорной группой. При отщеплении этой группы от пептидного субстрата ее хромофорные свойства смещаются к длине волны, при которой становится возможным произвести спектрофотометрическое определение. Субстрат обычно растворяют в воде и используют в концентрациях 0,2–2 ммоль/л. Субстрат также может содержать подходящие ингибиторы для прекращения дальнейшего образования фактора Ха и супрессирования активности тромбина, что улучшает селективность метода в отношении фактора Ха.

МЕТОДИКА КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Восстанавливают полное содержимое одной ампулы препарата сравнения и испытуемого препарата путем добавления подходящего количества *воды R*; используют немедленно. К восстановленным препаратам добавляют прерастворитель в количестве, достаточном для получения растворов с содержанием от 0,5 до 2,0 МЕ/мл.

Прерастворитель представляет собой плазму, собранную у пациента, страдающего острой гемофилией А, или искусственно приготовленный реагент, который приводит к получению результатов, существенно не отличающихся от результатов, получаемых при использовании гемофилической плазмы и аналогичных испытуемых и стандартных образцов. Полученные материалы предварительного растворения должны быть стабильны в течение времени, необходимого для проведения определения, т.е. не менее 30 минут при 20^0С. Их следует использовать в течение 15 минут.

Готовят дальнейшие разведения испытуемого и стандартного препаратов с использованием изотонического нехелатирующего буфера, содержащего 1% человеческого или бычьего альбумина и, например, трис-(гидроксиметил)-аминометан или имидазол, предпочтительно буферизированного при pH от 7,3 до 8,0. Готовят не менее трех отдельных, независимых разведений каждого препарата. Предпочтительно каждое из разведений готовить в двух повторностях. Разведения готовят таким образом, чтобы окончательная концентрация фактора VIII на стадии образования фактора Ха была ниже 0,03 МЕ/мл, предпочтительно ниже 0,01 МЕ/мл.

Готовят контрольный раствор, включающий все компоненты, кроме фактора VIII.

Все разведения готовят в пластиковых пробирках и используют незамедлительно.

1-я стадия. Предварительно нагретые разведения образца сравнения фактора VIII и испытуемого препарата смешивают с соответствующим объемом предварительно нагретого реагента факторов свертывания крови или со смесью реагентов, его составляющих, и инкубируют смесь в пластиковых пробирках или ячейках планшета при температуре 37^0C. Концентрации компонентов в процессе образования фактора Ха должны соответствовать спецификациям, приведенным выше при описании реагентов. Активацию фактора Х проводят в течение подходящего промежутка времени, предпочтительно прерывая реакцию до достижения концентрацией фактора Ха ее максимального уровня с целью получения удовлетворительной линейной зависимости отклика от дозы. Время активации выбирается также таким образом, чтобы достичь линейного во времени образования фактора Ха. Подходящие периоды активации обычно находятся в пределах от 2 до 5 минут, но допускаются и другие значения, при условии получения таким образом лучшей линейности зависимости отклика от дозы.

2-я стадия. Активацию прерывают добавлением предварительно нагретого реагента, содержащего хромогенный субстрат. Проводят количественную оценку скорости расщепления субстрата, которая должна находиться в линейной зависимости от концентрации образовавшегося фактора Ха, измеряя изменение оптической плотности при соответствующей длине волны с помощью спектрофотометра. Оптическую плотность отслеживают постоянно, получая таким образом возможность вычислить начальную скорость расщепления субстрата, либо прерывают реакцию гидролиза по окончании подходящего промежутка времени путем понижения pH добавлением подходящего реагента, например, уксусной кислоты (50 объемных процентов $C_2H_4O_2$) или раствора цитрата (1 моль/л) с pH 3. Время гидролиза регулируют с целью достижения линейного характера образования хромофора во времени. Подходящими обычно являются периоды гидролиза от 3 до 15 минут, но допускаются и другие значения при условии получения таким образом лучшей линейности зависимости отклика от дозы.

Проверяют достоверность определения и вычисляют активность испытуемого препарата с использованием обычных статистических методов (например, *5.3. Статистический анализ результатов биологических испытаний и количественных определений*).

2.7.5. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕПАРИНА

Антикоагулянтную активность гепарина определяют *in vitro* путем сравнения его способности в заданных условиях замедлять свертывание обогащенной кальцием и цитратом овечьей плазмы с аналогичной способностью препарата сравнения гепарина, калиброванного в Международных Единицах.

Международная Единица (МЕ) – активность, проявляемая установленным количеством Международного стандарта, состоящего из высушенной из замороженного состояния натриевой соли гепарина, полученной из свиных кишечных слизистых оболочек. Эквивалент Международного стандарта в МЕ устанавливается Всемирной организацией здравоохранения.

Стандартный образец *гепарина натриевой соли BRP* калибруют в МЕ по сравнению с Международным стандартом с использованием изложенной ниже методики количественного определения.

Количественное определение выполняют одним из следующих методов установления начала свертывания с использованием пробирок и другого оборудования, соответствующего выбранному методу:

a) прямое визуальное наблюдение, предпочтительно, в отраженном свете на черном матовом фоне;

b) спектрофотометрическая регистрация изменения оптической плотности при длине волны около 600 нм;

c) визуальная фиксация изменения текучести путем производимого вручную опрокидывания пробирок;

d) механическая запись изменения текучести, определяемого по перемешиванию, с соблюдением мер предосторожности, направленных на минимизацию возмущений раствора в начальной стадии свертывания.

МЕТОДИКА КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Приведенные в тексте объемы являются примерными и могут быть адаптированы к используемой аппаратуре при условии соблюдения соотношений между различными объемами.

Стандартный образец *гепарина натриевой соли BRP* разбавляют раствором *натрия хлорида R* концентрацией 9 г/л до получения точно известного количества МЕ в миллилитре, и готовят аналогичный раствор испытуемого препарата, для которого ожидается такая же активность. Используя раствор *натрия хлорида R* концентрацией 9 г/л, из каждого раствора готовят ряд разведений в геометрической прогрессии так, чтобы время свертывания, получаемое для низшей концентрации, не менее чем в 1,5 раза превышало время в контрольном опыте, а время свертывания, получаемое для высшей концентрации, давало значение, приводящее к построению удовлетворительной логарифмической кривой зависимости отклика от дозы, что определяется в ходе предварительного испытания.

Помещают двенадцать пробирок в баню с ледяной водой. Помечают их следующим образом: два ряда (T_1, T_2, T_3) для разведений испытуемого препарата и два ряда (S_1, S_2, S_3) для разведений препарата сравнения. В каждую из пробирок помещают по 1,0 мл размороженного *субстрата плазмы R1* и 1,0 мл соответствующего разведения испытуемого препарата или препарата сравнения.

После каждого из добавлений производят перемешивание, не допуская образования пузырьков. Для дальнейших манипуляций пробирки отбирают в порядке: S_1, S_2, S_3, T_1, T_2, T_3. Каждую из пробирок приблизительно на 15 минут помещают в водяную баню, нагретую до температуры 37^0С, и добавляют к каждой из них 1 мл разведения *цефалина R*, к которому был добавлен соответствующий активатор, например, каолин, таким образом, чтобы время контрольного опыта было подходящим и не превышало 60 секунд. При использовании каолина непосредственно перед проведением испытания готовят смесь равных объемов *цефалина R* и суспензии *легкого каолина R* с его содержанием 4 г/л в растворе *натрия хлорида R* концентрацией 9 г/л. Ровно через 2 минуты добавляют 1 мл раствора *кальция хлорида R* концентрацией 3,7 г/л и регистрируют в качестве времени свертывания интервал, в секундах, между последним добавлением и началом свертывания, определяемым с помощью выбранного метода. В начале и в конце процедуры аналогичным образом определяют время контрольного опыта, используя вместо одного из разбавлений гепарина 1 мл раствора *натрия хлорида R* концентрацией 9 г/л; два полученных контрольных значения не должны существенно различаться. Времена свертывания переводят в логарифмы, используя средние значения для дублирующихся пробирок. Процедуру повторяют со свежими

разведениями, проводя инкубации в порядке: T_1, T_2, T_3, S_1, S_2, S_3. Результаты вычисляют с использованием обычных статистических методов.

Проводят не менее трех независимых определений. Для каждого из таких определений готовят свежие растворы препарата сравнения и испытуемого препарата, и используют новую свежеразмороженную порцию субстрата плазмы.

Активность испытуемого препарата вычисляют путем комбинирования результатов этих определений с использованием обычных статистических методов. Если отклонение, вызванное различиями между результатами определений, является значительным при *P* = 0,01, комбинированная оценка активности может быть получена путем вычисления простого среднего значения оценок активности.

Количественное определение гепарина в субстанции и готовых лекарственных формах может быть выполнено с использованием реакции антикоагуляции в соответствии с нижеизложенным методом.

Антикоагулянтная активность. Определение активности гепарина проводят биологическим методом по способности его задерживать свертывание нитратной бараньей или бычьей плазмы, путем сопоставления активности испытуемого препарата с активностью гепарина - стандартного образца.

В два ряда тщательно вымытых и высушенных пробирок вносят возрастающее количество рабочих растворов стандартного образца гепарина, испытуемого препарата гепарина и раствора натрия хлорида изотонического 0,9 % в количествах, указанных в таблице. После этого в каждую пробирку прибавляют по 1 мл плазмы, затем по 0,2 мл рабочего раствора кальция хлорида (попеременно в пробирки из ряда с раствором стандартного образца гепарина и испытуемого препарата гепарина), смешивают содержимое осторожно, поворачиванием и легким встряхиванием, не допуская образования пузырей, отмечают время и оставляют при комнатной температуре (или в термостате при температуре 37°C) на 1 ч. По истечении указанного времени определяют состояние плазмы в каждой пробирке и отмечают в каждом ряду крайнюю слева пробирку, в которой не произошло полное свертывание плазмы.

Эти пробирки содержат наименьшие объемы растворов стандартного образца гепарина и испытуемого препарата гепарина, которые задерживают свертывание плазмы.

	Порядок внесения раствора										
Наименование раствора	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Раствор гепарина, мл	0,30	0,35	0,40	0,45	0,50	0,55	0,60	0,65	0,70	0,75	0,80
Раствор натрия хлорида изотонический 0,9 %, мл	0,50	0,45	0,40	0,35	0,30	0,25	0,20	0,15	0,10	0,05	-

Антикоагулянтную активность (X) препарата, в ЕД/мл, вычисляют по формуле:

$$X = \frac{V_1}{V_2} \cdot A,$$

где

V_1 - наименьший объем раствора стандартного образца гепарина, задерживающий свертывание плазмы, в миллилитрах;

V_2 - наименьший объем испытуемого раствора гепарина, задерживающий свертывание плазмы, в миллилитрах;

А - предполагаемая активность.

Определение проводят не менее трех раз и берут средний результат.

Примечания:

1. Приготовление 8 % раствора натрия цитрата. 8 г натрия цитрата помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 70 мл воды, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Раствор используют свежеприготовленным.

2. Приготовление 10 % раствора кальция хлорида. 10 г кальция хлорида безводного помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 70 мл воды, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Срок годности раствора 1 месяц при температуре от 0 до +4°С.

3. Приготовление плазмы. Кровь, вытекающую из сосудов убойного животного, собирают в банки из полиэтилена вместимостью 1 л, содержащие от 25 до 30 мл 8 % раствора натрия цитрата.

Кровь осторожно смешивают с 8 % раствором натрия цитрата, поворачивая баню, и как можно быстрее центрифугируют при 2500 об/мин в течение 30 минут, после чего плазму отсасывают.

Плазму хранят в замороженном состоянии при температуре от -10 до -20°С во флаконах вместимостью от 50 до 150 мл, избегая ее оттаивания.

Перед употреблением плазму размораживают на водяной бане или термостате при температуре 37 ± 0,5°С. Затем плазму фильтруют через марлю, проверяют время ее свертывания и оценивают оптимальное количество кальция хлорида, необходимое для определения активности: в 5 пробирок с 1 мл плазмы в каждой прибавляют возрастающие количества 10 % раствора кальция хлорида (0,02 - 0,04 - 0,06 - 0,08 -0,10 мл) и осторожно смешивают. Для опыта используют плазму, время свертывания которой не превышает 10 минут и то оптимальное количество кальция хлорида, которое вызывает полное свертывание плазмы в указанное время. Найденное оптимальное количество кальция хлорида должно содержаться в 0,2 мл рабочего раствора (этот раствор готовят разведением 10 % раствора кальция хлорида). Срок годности плазмы 1 год при температуре от - 10 до -20°С.

4. Приготовление раствора стандартного образца гепарина. Навеску гепарина - стандартного образца растворяют в растворе натрия хлорида изотоническом 0,9 % с таким расчетом, чтобы в 1 мл раствора содержалось 50 ЕД.

Срок годности раствора 6 месяцев при температуре от 0° С до +4 °С.

Предварительно из гепарина - стандартного образца готовят растворы, содержащие в 1 мл 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 ЕД. По 0,5 и 0,72 мл полученных растворов помещают в пробирки, доводят объем раствора в пробирке до 0,8 мл раствором натрия хлорида изотоническим 0,9 %. Затем прибавляют по 1 мл плазмы и 0,2 мл кальция хлорида оптимальной концентрации и перемешивают.

Через 1 час определяют состояние плазмы в каждой пробирке и устанавливают активность раствора гепарина - стандартного образца, при которой в пробирке, содержащей 0,5 мл раствора гепарина, происходит полное свертывание плазмы, а в другой пробирке, содержащей 0,72 мл этого раствора гепарина, плазма не свернулась. Выбранная активность обеспечивает наблюдение за влиянием испытуемого гепарина - стандартного образца на свертывание плазмы по истечении

часа. Обычно эта активность находится в пределах 1 - 1,5 ЕД для плазмы КРС и 1 - 3,5 ЕД для бараньей плазмы.

5. Приготовление раствора испытуемого препарата. Навеску препарата растворяют в растворе натрия хлорида изотоническом 0,9%, исходя из его предполагаемой активности с таким расчетом, чтобы 1 мл полученного раствора содержал столько же единиц гепарина, сколько содержит 1 мл раствора гепарина - стандартного образца. Раствор используют свежеприготовленным.

6. При необходимости разрешается сдвигать ряд пробирок, указанный в таблице, в сторону уменьшения концентрации раствора гепарина.

2.7.6. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВАКЦИНЫ ДИФТЕРИИ (АДСОРБИРОВАННОЙ)

Количественное определение вакцины дифтерии (адсорбированной) производят путем сравнения дозы вакцины, необходимой для защиты морских свинок от эффектов либо эритрогенной дозы вводимого интрадермально токсина дифтерии, либо летальной дозы вводимого подкожно токсина дифтерии, с дозой препарата сравнения, калиброванного в Международных Единицах, требующейся для получения такой же защиты.

За Международную Единицу принимают активность в установленном количестве Международного Стандарта, состоящего из дифтерийного анатоксина, адсорбированного на гидроксиде алюминия. Эквивалентность Международного Стандарта в Международных Единицах устанавливается Всемирной организацией здравоохранения.

В нижеописанном методе количественного определения используется модель параллельных линий с использованием трех разведений испытуемого и стандартного препаратов. Если аналитик обладает достаточно большим опытом работы с применением этого метода для данной вакцины, разрешается использовать упрощенную модель, включающую одно разведение для испытуемого и стандартного препаратов. Такая модель позволяет определять, обладает ли вакцина активностью, существенно превышающей необходимый минимум, но не дает информации о линейности и параллельности и кривой зависимости отклика от дозы. Упрощенная модель приводит к существенному уменьшению требуемого количества экспериментальных животных; она должна приниматься во внимание каждым аналитиком в соответствии с положениями Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях.

МЕТОД ИНТРАДЕРМАЛЬНОЙ ПРОВОКАЦИИ

Выбор и распределение испытуемых животных. В испытании используют здоровых белых морских свинок из одной партии размером, подходящим для предписанного количества точек введения. Разница в массе между самым тяжелым и самым легким животным не должна превышать 100 г. Морских свинок делят не менее чем на шесть равных групп; количество животных в группах должно быть достаточным для получения результатов, выдерживающих требования к достоверности определения, приведенные ниже. Если не было показано, что используемый токсин достаточно стабилен, или если он не был адекватным образом стандартизирован, используют пять морских свинок в качестве невакцинированного

контроля. Используют морских свинок одного пола; в иных случаях самцы и самки должны быть равномерно распределены по группам.

Выбор провокационного токсина. Препарат токсина дифтерии должен содержать от 67 до 133 lr/100 в 1 Lf и от 25000 до 50000 минимальных реактивных доз для кожи морских свинок в 1 Lf. Если было показано, что препарат токсина обладает стабильностью, проверка его активности перед каждым определением не является обязательной.

Приготовление раствора провокационного токсина. Непосредственно перед использованием провокационный токсин разбавляют подходящим растворителем с получением раствора провокационного токсина, содержащего около 0,0512 Lf в 0,2 мл. Из него путем дальнейших четырехкратных разведений получают ряд из пяти растворов, содержащих около 0,0128, 0,0032, 0,0008, 0,0002 и 0,00005 Lf в 0,2 мл.

Определение активности вакцины. Используя раствор *натрия хлорида R* концентрацией 9 г/л, готовят разведения испытуемой вакцины и препарата сравнения таким образом, чтобы для каждого из препаратов был получен ряд не более чем с 2,5-кратным различием между последовательными разведениями, и в котором промежуточные разведения при подкожном введении морской свинке в дозе 1,0 мл приводят в результате провокации к получению интрадермальной суммы, составляющей около 3. Каждое разведение назначают одной из групп морских свинок, каждой из которых вводят подкожно по 1,0 мл этого разведения. Через 28 дней каждой морской свинке обривают оба бока и вводят интрадермально по 0,2 мл каждого из шести разведений токсина в шесть различных точек на коже каждой из вакцинированных морских свинок таким образом, чтобы минимизировать помехи между соседними локализациями.

Определение активности провокационного токсина. При необходимости, невакцинированным контрольным животным вводят разведения, содержащие 80, 40, 20, 10 и 5 миллионных долей Lf провокационного токсина.

Получение и интерпретация результатов. Все точки провокации контролируют через 48 часов после инъекции провокационного токсина и записывают частоту возникновения специфической дифтерийной эритемы. Записывают также количество точек, в которых такие реакции не возникли и обозначают это количество как сумму интрадермальной провокации. Суммы интрадермальной провокации для всех животных, получивших одно и то же разведение вакцины, сводят в таблицу и используют эти данные после подходящего преобразования, например, $(\text{сумма})^2$ или $\arcsin((\text{сумма}/6)^2)$ для оценки относительной активности для каждого из испытуемых препаратов методом параллельных линий.

Требования к достоверности определения. Результаты испытания являются достоверными, если:

- как для испытуемой вакцины, так и для препарата сравнения, средняя сумма, полученная для нижнего уровня дозировки, менее 3, а средняя сумма, полученная для верхнего уровня дозировки, более 3,

- в случае проведения соответствующего испытания, разведение токсина с содержанием 40 миллионных долей Lf приводит к положительной эритеме не менее чем у 80% морских свинок, а разведение с содержанием 20 миллионных долей Lf приводит к положительной эритеме менее чем у 80% морских свинок (если эти критерии не выполняются, следует выбрать другой токсин),

- границы доверительного интервала определения (*P* = 0,95) составляют от 50 до 200% от оцененного значения активности,

- при статистическом анализе не выявляется отклонений от линейности и параллельности.

Испытание может быть выполнено повторно, но если было проведено более одного определения, то при оценке активности должны учитываться результаты всех достоверных экспериментов.

МЕТОД ЛЕТАЛЬНОЙ ПРОВОКАЦИИ

Выбор и распределение испытуемых животных. В испытании используют здоровых морских свинок из одной партии с массой тела от 250 до 350 г. Морских свинок делят не менее, чем на шесть равных групп; количество животных в группах должно быть достаточным для получения результатов, выдерживающих требования к достоверности определения, приведенные ниже. Если не было показано, что используемый токсин достаточно стабилен, или если он не был адекватным образом стандартизирован, дополнительно используют четыре группы по пять морских свинок в качестве невакцинированного контроля. Используют морских свинок одного пола; в иных случаях самцы и самки должны быть равномерно распределены по группам.

Выбор провокационного токсина. Препарат токсина дифтерии должен содержать не менее 100 LD_{50} в миллилитре. Если было показано, что препарат токсина обладает стабильностью, проверка его активности перед каждым определением не является обязательной.

Приготовление раствора провокационного токсина. Непосредственно перед использованием провокационный токсин разбавляют подходящим растворителем с получением раствора провокационного токсина, содержащего около 100 LD_{50} в миллилитре. При необходимости порции раствора провокационного токсина разбавляют тем же растворителем в соотношениях 1:32, 1:100 и 1:320.

Определение активности вакцины. Используя раствор *натрия хлорида R* концентрацией 9 г/л, готовят разведения испытуемой вакцины и препарата сравнения таким образом, чтобы для каждого из препаратов был получен ряд с не более чем 2,5-кратным различием между последовательными разведениями и в котором промежуточные разведения при подкожном введении морской свинке в дозе 1,0 мл защищают около 50% животных от летальных эффектов, вызываемых подкожным введением количества дифтерийного токсина, предписанного для этого испытания. Растворы каждого разведения назначают одной из групп морских свинок, каждой из которых вводят подкожно по 1,0 мл этого разведения. Через 28 дней каждому животному вводят подкожно по 1,0 мл раствора провокационного токсина (100 LD_{50}).

Определение активности провокационного токсина. При необходимости, раствор провокационного токсина и три приготовленных из него разведения назначают по одному каждой из 4 групп по 5 морских свинок и вводят подкожно по 1,0 мл каждого разведения каждой из морских свинок группы, которой это разведение было назначено.

Получение и интерпретация результатов. Через 4 дня после инъекции провокационного токсина подсчитывают число выживших морских свинок. Активность испытуемой вакцины вычисляют относительно активности препарата сравнения с использованием обычных статистических методов на основе пропорции выживших животных в каждой из групп вакцинированных морских свинок.

Требования к достоверности определения. Результаты испытания являются достоверными, если:

- как для испытуемой вакцины, так и для препарата сравнения, 50% защитная доза заключена в интервале между наибольшей и наименьшей дозами препарата, введенными морским свинкам,

- в случае проведения соответствующего испытания, количество погибших животных в 4 группах по 5 морских свинок, которым был введен раствор провокационного токсина и его разведения, указывает на то, что провокационная доза приблизительно соответствует 100 LD_{50},

- границы доверительного интервала определения (*P* = 0,95) составляют от 50 до 200% от оцененного значения активности,

- при статистическом анализе не выявляется отклонений от линейности и параллельности.

Испытание может быть выполнено повторно, но если было проведено более одного определения, то при оценке активности должны учитываться результаты всех достоверных экспериментов.

2.7.7. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВАКЦИНЫ КОКЛЮША

Активность вакцины коклюша определяют путем сравнения дозы вакцины, необходимой для защиты мышей от эффектов летальной дозы *Bordetella pertussis*, вводимой интрацеребрально, с количеством препарата сравнения, калиброванного в Международных Единицах, требующимся для получения такой же защиты.

За Международную Единицу принимают активность в установленном количестве Международного Стандарта, состоящего из высушенной вакцины коклюша. Эквивалентность Международного Стандарта в Международных Единицах устанавливается Всемирной организацией здравоохранения.

Выбор и распределение испытуемых животных. В испытании используют здоровых мышей подходящей линии из одной партии, возрастом менее 5 недель. Разница в массе между самым тяжелым и самым легким животным не должна превышать 5 г. Мышей делят на шесть групп не менее чем по 16 особей и 4 группы по 10 особей. Используют мышей одного пола; в иных случаях самцы и самки должны быть равномерно распределены по группам.

Выбор провокационного штамма и приготовление суспензии для провокации. Выбирают подходящий штамм *B. pertussis*, способный привести к гибели мышей в течение 14 дней после интрацеребральной инъекции. Если в течение 48 часов после инъекции погибает более 20% мышей, штамм является неподходящим. Выполняют один пересев штамма и суспендируют собранные *B. pertussis* в растворе, содержащем 10 г/л *гидролизата казеина R* и 6 г/л *натрия хлорида R*, и имеющем показатель pH от 7,0 до 7,2, либо в другом подходящем растворе. Определяют степень мутности суспензии. Готовят ряд разведений с использованием того же раствора и назначают их по одному каждой из групп по десять мышей. Каждой мыши вводят интрацеребрально дозу (0,02 или 0,03 мл) разведения, назначенного группе, к которой она принадлежит. Через 14 дней подсчитывают в каждой группе количество выживших мышей. Из этих результатов вычисляют ожидаемую степень мутности суспензии, содержащей 100 LD_{50} в каждой провокационной дозе. Для оценки активности испытуемой вакцины производят

свежий пересев того же штамма *B. pertussis* и готовят из собранных организмов суспензию со степенью мутности, соответствующей приблизительно 100 LD_{50} в каждой провокационной дозе. Готовят 3 разведения провокационной суспензии.

Определение активности. Готовят 3 серийных разведения испытуемой вакцины и 3 аналогичных разведения препарата сравнения так, чтобы для каждого из промежуточных разведений ожидаемая степень защиты мышей от летальных эффектов провокационной дозы *B. pertussis* составляла 50%. Предлагаемые дозы составляют 1/8, 1/40 и 1/200 доли человеческой дозы испытуемой вакцины и 0,5 МЕ, 0,1 МЕ и 0,02 МЕ препарата сравнения. Каждая из доз содержится в объеме, не превышающем 0,5 мл. 6 разведений назначают по одному каждой из групп, состоящих не менее, чем из 16 мышей, и вводят каждой из мышей внутрибрюшинно одну дозу разведения, назначенного группе, к которой относится данное животное. Через 14–17 дней каждому животному из этих групп вводят интрацеребрально одну дозу суспензии для провокации. Суспензию для провокации и три ее разведения назначают по одному каждой из групп по 10 мышей и вводят каждой из мышей интрацеребрально одну дозу каждой суспензии, назначенной группе, к которой относится данное животное. Мышей, погибших в течение 48 часов после провокации, не учитывают при оценке результатов. В каждой из групп подсчитывают количество мышей, выживающих после 14 дней. Активность испытуемой вакцины вычисляют относительно активности препарата сравнения на основе количества животных, выживших в каждой из групп из не менее 16 особей.

Результаты испытания являются достоверными, если:

- как для испытуемой вакцины, так и для препарата сравнения, 50% защитная доза заключена в интервале между наибольшей и наименьшей дозами препарата, введенными морским свинкам,

- количество погибших животных в 4 группах по 10 мышей, которым была введена провокационная суспензия и ее разведения, указывает на то, что провокационная доза приблизительно соответствует 100 LD_{50},

- при статистическом анализе не выявляется отклонений от линейности и параллельности.

Испытание может быть выполнено повторно, но если было проведено более одного определения, то при оценке активности должны учитываться результаты всех достоверных экспериментов.

2.7.8. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВАКЦИНЫ СТОЛБНЯКА (АДСОРБИРОВАННОЙ)

Количественное определение вакцины столбняка (адсорбированной) производят путем сравнения дозы вакцины, необходимой для защиты морских свинок или мышей от эффектов паралитической дозы вводимого подкожно токсина столбняка, с дозой препарата сравнения, калиброванного в Международных Единицах, требующейся для получения такой же защиты. В странах, где метод паралича не является обязательным, может использоваться метод LD_{50}. В этом случае количества животных и методики идентичны описываемым для метода паралича, но за конечную точку принимают вместо паралича гибель животных.

За Международную Единицу принимают активность в установленном количестве Международного Стандарта, состоящего из столбнячного анатоксина, адсорбированного на гидроксиде алюминия. Эквивалентность Международного

Стандарта в Международных Единицах устанавливается Всемирной организацией здравоохранения.

В нижеописанном методе количественного определения используется модель параллельных линий с использованием трех разведений испытуемого и стандартного препаратов. Если аналитик обладает достаточно большим опытом работы с применением этого метода для данной вакцины, разрешается использовать упрощенную модель, включающую одно разведение для испытуемого и стандартного препаратов. Такая модель позволяет определять, обладает ли вакцина активностью, существенно превышающей необходимый минимум, но не дает информации о линейности и параллельности и кривой зависимости отклика от дозы. Упрощенная модель приводит к существенному уменьшению требуемого количества экспериментальных животных; она должна приниматься во внимание каждым аналитиком в соответствии с положениями Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях.

ИСПЫТАНИЕ НА МОРСКИХ СВИНКАХ

Выбор и распределение испытуемых животных. В испытании используют здоровых морских свинок из одной партии с массой тела от 250 до 350 г. Морских свинок делят не менее чем на шесть равных групп; количество животных в группах должно быть достаточным для получения результатов, выдерживающих требования к достоверности определения, приведенные ниже. Если не было показано, что используемый токсин достаточно стабилен, или если он не был адекватным образом стандартизирован, дополнительно используют четыре группы по пять морских свинок в качестве невакцинированного контроля. Используют морских свинок одного пола; в иных случаях самцы и самки должны быть равномерно распределены по группам.

Выбор провокационного токсина. Препарат токсина столбняка должен содержать не менее пятидесятикратной 50%-ной паралитической дозы в миллилитре. Если было показано, что препарат токсина обладает стабильностью, проверка его паралитической дозы перед каждым определением не является обязательной.

Приготовление раствора провокационного токсина. Непосредственно перед использованием провокационный токсин разбавляют подходящим растворителем с получением раствора провокационного токсина, содержащего около пятидесятикратной 50%-ной паралитической дозы в миллилитре. При необходимости порции раствора провокационного токсина разбавляют тем же растворителем в соотношениях 1:16, 1:50 и 1:160.

Определение активности вакцины. Используя раствор *натрия хлорида R* концентрацией 9 г/л, готовят разведения испытуемой вакцины и препарата сравнения таким образом, чтобы для каждого из препаратов был получен ряд с не более чем 2,5-кратным различием между последовательными разведениями и в котором промежуточные разведения при подкожном введении морской свинке в дозе 1,0 мл защищают около 50% животных от паралитических эффектов, вызываемых подкожным введением количества токсина столбняка, предписанного для этого испытания. Каждое разведение назначают одной из групп морских свинок, каждой из которых вводят подкожно по 1,0 мл этого разведения. Через 28 дней каждому животному вводят подкожно по 1,0 мл раствора провокационного токсина (содержащего пятидесятикратную 50%-ную паралитическую дозу).

Определение активности провокационного токсина. При необходимости, раствор провокационного токсина и три приготовленных из него разведения назначают по одному каждой из 4 групп по 5 морских свинок и вводят подкожно по 1,0 мл каждого разведения каждой из морских свинок группы, которой это разведение было назначено.

Получение и интерпретация результатов. Состояние морских свинок оценивают дважды в день. Животных с определенными признаками столбнячного паралича изымают и гуманным образом умерщвляют. Через 5 дней после инъекции провокационного токсина подсчитывают число непарализованных морских свинок. Активность испытуемой вакцины вычисляют относительно активности препарата сравнения с использованием обычных статистических методов на основе пропорции непарализованных животных в каждой из групп вакцинированных морских свинок.

Требования к достоверности определения. Результаты испытания являются достоверными, если:

- как для испытуемой вакцины, так и для препарата сравнения, 50% защитная доза заключена в интервале между наибольшей и наименьшей дозами препарата, введенными морским свинкам,

- в случае проведения соответствующего испытания, количество парализованных животных в 4 группах по 5 морских свинок, которым был введен раствор провокационного токсина и его разведения, указывает на то, что провокация составляла около пятидесятикратной 50%-ной паралитической дозы,

- границы доверительного интервала определения (*P* = 0,95) составляют от 50 до 200% от оцененного значения активности,

- при статистическом анализе не выявляется отклонений от линейности и параллельности.

Испытание может быть выполнено повторно, но если было проведено более одного определения, то при оценке активности должны учитываться результаты всех достоверных экспериментов.

ИСПЫТАНИЕ НА МЫШАХ

Выбор и распределение испытуемых животных. В испытании используют здоровых мышей из одной партии с массой тела от 14 до 20 г. Мышей делят не менее чем на шесть равных групп; количество животных в группах должно быть достаточным для получения результатов, выдерживающих требования к достоверности определения, приведенные ниже. Если не было показано, что используемый токсин достаточно стабилен, или если он не был адекватным образом стандартизирован, дополнительно используют четыре группы по шесть мышей в качестве невакцинированного контроля. Используют мышей одного пола; в иных случаях самцы и самки должны быть равномерно распределены по группам.

Выбор провокационного токсина. Препарат токсина столбняка должен содержать не менее стократной 50%-ной паралитической дозы в миллилитре. Если было показано, что препарат токсина обладает стабильностью, проверка его паралитической дозы перед каждым определением не является обязательной.

Приготовление раствора провокационного токсина. Непосредственно перед использованием провокационный токсин разбавляют подходящим растворителем с получением раствора провокационного токсина, содержащего около пятидесятикратной 50%-ной паралитической дозы в 0,5 мл. При необходимости порции раствора провокационного токсина разбавляют тем же растворителем в соотношениях 1:16, 1:50 и 1:160.

Определение активности вакцины. Используя раствор *натрия хлорида R* концентрацией 9 г/л, готовят разведения испытуемой вакцины и препарата сравнения таким образом, чтобы для каждого из препаратов был получен ряд с не более чем 2,5-кратным различием между последовательными разведениями и в котором промежуточные разведения при подкожном введении мыши в дозе 0,5 мл защищают около 50% животных от паралитических эффектов, вызываемых подкожным введением количества токсина столбняка, предписанного для этого испытания. Каждое разведение назначают одной из групп мышей, каждой из которых вводят подкожно по 0,5 мл этого разведения. Через 28 дней каждому животному вводят подкожно по 0,5 мл раствора провокационного токсина (содержащего пятидесятикратную 50%-ную паралитическую дозу).

Определение активности провокационного токсина. При необходимости раствор провокационного токсина и три приготовленных из него разведения назначают по одному каждой из 4 групп по 6 мышей и вводят подкожно по 0,5 мл каждого разведения каждой из мышей группы, которой это разведение было назначено.

Получение и интерпретация результатов. Состояние мышей оценивают дважды в день. Животных с определенными признаками столбнячного паралича изымают и гуманным образом умерщвляют. Через 4 дня после инъекции провокационного токсина подсчитывают число непарализованных мышей. Активность испытуемой вакцины вычисляют относительно активности препарата сравнения с использованием обычных статистических методов на основе пропорции непарализованных животных в каждой из шести групп вакцинированных мышей.

Требования к достоверности определения. Результаты испытания являются достоверными, если:

- как для испытуемой вакцины, так и для препарата сравнения, 50% защитная доза заключена в интервале между наибольшей и наименьшей дозами препарата, введенными мышам,

- в случае проведения соответствующего испытания, количество парализованных животных в 4 группах по 6 мышей, которым был введен раствор провокационного токсина и его разведения, указывает на то, что провокация составляла около пятидесятикратной 50%-ной паралитической дозы,

- границы доверительного интервала определения (P = 0,95) составляют от 50 до 200% от оцененного значения активности,

- при статистическом анализе не выявляется отклонений от линейности и параллельности.

Испытание может быть выполнено повторно, но если было проведено более одного определения, то при оценке активности должны учитываться результаты всех достоверных экспериментов.

2.7.9. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ Fc-ФРАГМЕНТА ИММУНОГЛОБУЛИНА

Стабилизированная человеческая кровь. Человеческую кровь группы 0 собирают в антикоагулянтный раствор ACD. Стабилизированную кровь хранят при 4^0C не более 3 недель.

Раствор хлорида натрия в фосфатном буфере pH 7,2. 1,022 г *безводного натрия гидрофосфата R*, 0,336 г *безводного натрия дигидрофосфата R* и 8,766 г *натрия хлорида R* растворяют в 800 мл *воды R* и разбавляют до 1000 мл тем же растворителем.

Основной раствор магния и кальция. 1,103 г *кальция хлорида R* и 5,083 г *магния хлорида R* растворяют в воде и разбавляют до 25 мл тем же растворителем.

Основной буферный раствор барбитала. 207,5 г *натрия хлорида R* и 25,48 г *барбитала натриевой соли R* растворяют в 4000 мл *воды R* и доводят значение pH до 7,3 *1 М хлористоводородной кислотой.* Добавляют 12,5 мл основного раствора кальция и магния и разбавляют *водой R* до 5000 мл. Фильтруют через мембранный фильтр (размер пор 0,22 мкм). Хранят при 4^0С в стеклянных контейнерах.

Буферный раствор альбумина и барбитала. 0,150 г *бычьего альбумина R* растворяют в 20 мл основного буферного раствора барбитала и разбавляют *водой R* до 100 мл.

Раствор дубильной кислоты. 10 мг *дубильной кислоты R* растворяют в 100 мл раствора хлорида натрия в фосфатном буфере pH 7,2. Готовят непосредственно перед использованием.

Комплемент морских свинок. Готовят пул сыворотки из крови не менее 10 морских свинок. Сыворотку отделяют от свернувшейся крови центрифугированием при температуре около 4^0С. Сыворотку хранят в небольших количествах при температуре ниже -70^0. Непосредственно перед началом гемолиза, инициируемого комплементом, разбавляют буферным раствором альбумина и барбитала до содержания 125–200 CH_{50} в миллилитре и хранят в процессе испытания на ледяной бане.

CH_{50} (гемолитическая единица активности комплемента) – концентрация комплемента в контрольной сыворотке, вызывающая в данных реакционных условиях теста агглютинации лизис 50% эритроцитов.

Антиген краснухи. Соответствующий антиген краснухи для титрования по ингибированию гемагглютинации (HIT). Титр должен составлять более 256 НА-единиц.

Приготовление таннированных человеческих эритроцитов. Эритроциты отделяют центрифугированием соответствующего объема стабилизированной человеческой крови. Промывают клетки не менее трех раз раствором хлорида натрия в фосфатном буфере pH 7,2 и суспендируют в том же растворе, получая суспензию концентрацией 2 объемных процента. 0,1 мл раствора дубильной кислоты разбавляют до 7,5 мл раствором хлорида натрия в фосфатном буфере pH 7,2 (окончательная концентрация 1,3 мг/л). 1 объем свежеприготовленного разведения смешивают с 1 объемом суспензии эритроцитов и инкубируют при 37^0С в течение 10 минут. Клетки отделяют центрифугированием (400–800 *g* в течение 10 минут), супернатант удаляют, а клетки однократно промывают раствором хлорида натрия в фосфатном буфере pH 7,2. Таннированные клетки снова суспендируют в растворе хлорида натрия в фосфатном буфере pH 7,2, получая суспензию концентрацией 1 объемный процент.

Покрытие антигенами таннированных человеческих эритроцитов. К соответствующему объему (V_s) таннированных клеток добавляют антиген краснухи (0,2 мл на 1,0 мл клеток) и инкубируют при 37^0С в течение 30 минут. Клетки отделяют центрифугированием (400–800 *g* в течение 10 минут) и отбрасывают супернатант, оставляя объем 200 мкл. Добавляют буферный раствор альбумина и

барбитала, объем которого равен объему отброшенного супернатанта, клетки ресуспендируют и отделяют, как описано выше, и повторяют операцию промывки. Оставшиеся 200 мкл доводят до объема, составляющего ¾ V_s, получая таким образом начальный объем (V_i). 900 мкл буферного раствора альбумина и барбитала смешивают с 100 мкл V_i, получая таким образом остаточный объем (V_r), и определяют исходную оптическую плотность при длине волны 541 нм (A). V_r разбавляют буферным раствором альбумина и барбитала с коэффициентом разведения, равным A, получая таким образом конечный корректированный объем $V_f = V_r \times A$ сенсибилизированных человеческих эритроцитов и значение A десятикратного разведения, составляющее после коррекции $1{,}0 \pm 0{,}1$.

Связывание антителами таннированных человеческих эритроцитов, покрытых антигенами. Готовят последовательность следующих растворов (каждый – в двух повторностях), используя для каждого из них отдельную кювету для полумикроопределений (например, одноразового применения) или пробирку:

(1) *Испытуемые растворы*. При необходимости доводят значение pH испытуемого иммуноглобулина до 7, например, добавлением *1 М раствора гидроксида натрия.* Объемы испытуемого препарата, содержащие 30 и 40 мг иммуноглобулина, доводят до 900 мкл буферным раствором альбумина и барбитала.

(2) *Растворы сравнения*. Готовят так же, как и испытуемые растворы с использованием *человеческого иммуноглобулина BRP*.

(3) *Контроль комплемента*. 900 мкл буферного раствора альбумина и барбитала.

К содержимому каждой кюветы или пробирки добавляют по 100 мкл сенсибилизированных человеческих эритроцитов и хорошо перемешивают.

Инкубируют при комнатной температуре в течение 15 минут, добавляют 1000 мкл буферного раствора альбумина и барбитала, отделяют клетки центрифугированием кюветы или пробирки (1000 *g* в течение 10 минут) и отбрасывают 1900 мкл супернатанта. Добавляют вместо отброшенного супернатанта 1900 мкл буферного раствора альбумина и барбитала и повторяют всю операцию промывки, оставляя объем 200 мкл. Испытуемые образцы могут храниться в укупоренных кюветах (пробирках) при 4^0C в течение 24 часов.

Инициируемый комплементом гемолиз. Для измерения степени гемолиза к испытуемому образцу добавляют 600 мкл предварительно нагретого до 37^0C буферного раствора альбумина и барбитала, осторожно ресуспендируют клетки путем не менее чем пятикратных повторных пипетирований и помещают кювету в термостатированный держатель кювет спектрофотометра. Через 2 минуты добавляют 200 мкл разведенного комплемента морских свинок (125-200 CH_{50}/мл), тщательно перемешивают путем двукратного пипетирования и тотчас же после второго пипетирования начинают регистрацию оптической плотности при длине волны 541 нм в зависимости от времени с использованием в качестве раствора сравнения буферного раствора альбумина и барбитала. Измерение прекращают при очевидном прохождении графиком зависимости оптической плотности от времени точки перегиба.

Оценка. Определяют угол наклона (S) кривой гемолиза в районе точки перегиба путем сегментации участка с наибольшим уклоном на подходящие временные отрезки Δt (например, Δt = 1 мин) и вычисляют значения S между соседними точками пересечений, выраженные в ΔA/мин. Наибольшее значение S принимают за (S_{exp}). Кроме того, определяют оптическую плотность в начале измерения (A_s) путем

экстраполяции кривой, практически линейной и параллельной оси времени в течение первых нескольких минут. Значение (S_{exp}) корректируют по формуле:

$$S' = \frac{S_{\text{exp}}}{A_s}$$

Вычисляют среднее арифметическое значений S’ для каждого препарата. Вычисляют индекс функции Fc (I_{Fc}) по формуле:

$$I_{Fc} = \frac{100 \cdot (\overline{S'} - \overline{S'_c})}{\overline{S'_s} - \overline{S'_c}},$$

где:

$\overline{S'}$ - среднее арифметическое корректированного угла наклона для испытуемого препарата,

$\overline{S'_s}$ - среднее арифметическое корректированного угла наклона для препарата сравнения,

$\overline{S'_c}$ - среднее арифметическое корректированного уклона для контроля комплемента.

Вычисляют индекс функции Fc для испытуемого препарата: значение должно быть не ниже указанного на листке-вкладыше, сопровождающем препарат сравнения.

2.7.10. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФАКТОРА СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА VII

Количественное определение фактора свертывания крови VII производят по его биологической активности в виде комплекса фактора VIIa с тканевым фактором при активации фактора X в присутствии ионов кальция и фосфолипидов. Активность препарата фактора VII оценивают путем сравнения количества, необходимого для достижения определенной скорости образования фактора Xa в испытуемой смеси, содержащей вещества, принимающие участие в активации фактора X, и количества Международного Стандарта или препарата сравнения, калиброванного в Международных Единицах, которое требуется для достижения такой же скорости образования фактора Xa.

За Международную Единицу принимают активность фактора VII в установленном количестве Международного Стандарта, состоящего из высушенной из замороженного состояния плазмы. Эквивалентность Международного Стандарта в Международных Единицах устанавливается Всемирной организацией здравоохранения.

Хромогенный метод количественного определения включает две последовательные стадии. Первая стадия состоит в зависящей от фактора VII активации фактора X смесью реагентов, включающей тканевый фактор, фосфолипиды и ионы кальция. На второй стадии происходит ферментативное расщепление хромогенного субстрата фактором Xa с образованием хромофора, который определяют спектрофотометрически. В соответствующих условиях испытания существует линейная зависимость между скоростью образования фактора Xa и концентрацией фактора. Содержание метода количественного определения описывается схемой 2.7.10.-1:

1-я стадия a) Фактор VII $\xrightarrow{\text{Тканевый фактор} + Ca^{++}}$ Фактор VIIa

b) Фактор X $\xrightarrow{\text{Фактор VIIa} + Ca^{++} + \text{тканевый фактор/фосфолипид}}$ Фактор Xa

2-я стадия хромогенный субстрат $\xrightarrow{\text{Фактор Xa}}$ пептид + хромофор

Схема 2.7.10.-1. – *Схема количественного определения фактора коагуляции крови человека VII.*

В обеих стадиях используются реагенты, доступные из ряда коммерческих источников. Хотя в состав реагентов могут вноситься некоторые изменения, их основные свойства должны соответствовать нижеприведенным спецификациям.

РЕАГЕНТЫ

Реагент факторов коагуляции состоит из очищенных белков человеческого или говяжьего происхождения, включающих фактор X и тромбопластиновый тканевый фактор / фосфолипид в качестве активатора фактора VII. Эти белки подвергнуты частичной очистке и не должны содержать примесей, мешающих активации фактора VII или фактора X. Фактор X содержится в количествах, приводящих к конечной концентрации на первой стадии определения, находящейся в пределах от 10 до 350 нмоль/л, предпочтительно от 14 до 70 нмоль/л. В качестве тканевого фактора/фосфолипида может использоваться тромбопластин, полученный из природных источников, например, из мозга крупного рогатого скота или кроликов, или синтетический препарат. Тромбопластин, подходящий для использования в определении протромбинового периода, разбавляют буфером в соотношении от 1:5 до 1:50 так, чтобы окончательная концентрация ионов кальция составляла от 15 до 25 ммоль/л. Образование конечного фактора Xa проводят в растворе, содержащем человеческий или бычий альбумин в концентрации, не допускающей потери адсорбции, и соответствующим образом буферизированного до pH 7,3–8,0. В окончательной инкубационной смеси фактор VII должен быть единственным компонентом, лимитирующим скорость.

Вторая стадия включает количественное определение образовавшегося фактора Xa с использованием специфичного в отношении фактора Xa хромогенного субстрата. Обычно он представляет собой короткий пептид, состоящий из 3–5 аминокислотных остатков, присоединенный к хромофорной группе. При отщеплении этой группы от пептидного субстрата ее хромофорные свойства смещаются к длине волны, при которой становится возможным произвести спектрофотометрическое определение. Субстрат обычно растворяют в *воде R* и используют в конечных концентрациях 0,2–2 ммоль/л. Субстрат также может содержать подходящие ингибиторы для прекращения дальнейшего образования фактора Xa (добавка эдетата).

МЕТОДИКА КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Восстанавливают полное содержимое одной ампулы препарата сравнения и испытуемого препарата путем добавления подходящего количества *воды R*; используют в течение 1 часа. Восстановленные препараты дополнительно разбавляют прерастворителем, получая растворы с содержанием от 0,5 до 2,0 МЕ/мл фактора VII.

Готовят дальнейшие разведения испытуемого и стандартного препаратов с использованием изотонического нехелатирующего буфера, содержащего 1% человеческого или бычьего альбумина и предпочтительно буферизированного при pH от 7,3 до 8,0. Готовят не менее трех отдельных, независимых разведений каждого препарата. Предпочтительно каждое из разведений готовить в двух повторностях. Разведения готовят таким образом, чтобы окончательная концентрация фактора VII была ниже 0,005 МЕ/мл.

Готовят контрольный раствор, включающий все компоненты, кроме фактора VII.

Все разведения готовят в пластиковых пробирках и используют в течение 1 часа.

1-я стадия. Разведения образца сравнения фактора VII и испытуемого препарата смешивают с подходящим объемом предварительно нагретого реагента факторов свертывания крови или со смесью реагентов, его составляющих, и инкубируют смесь в пластиковых пробирках или ячейках планшета при температуре 37^0C. Концентрации компонентов в процессе образования фактора Xa должны соответствовать спецификациям, приведенным выше, при описании реагентов.

Активацию фактора X проводят в течение подходящего промежутка времени, предпочтительно прерывая реакцию до достижения концентрацией фактора Xa ее максимального уровня с целью получения удовлетворительной линейной зависимости отклика от дозы. Время активации выбирается также таким образом, чтобы достичь линейного во времени образования фактора Xa. Подходящие периоды активации обычно находятся в пределах от 2 до 5 минут, но допускаются и другие значения при условии получения таким образом приемлемой линейности зависимости отклика от дозы.

2-я стадия. Активацию прерывают добавлением предварительно нагретого реагента, содержащего хромогенный субстрат. Проводят количественную оценку скорости расщепления субстрата, которая должна находиться в линейной зависимости от концентрации образовавшегося фактора Xa, измеряя изменение оптической плотности при соответствующей длине волны с помощью спектрофотометра. Оптическую плотность отслеживают постоянно, получая таким образом возможность вычислить начальную скорость расщепления субстрата, либо прерывают реакцию гидролиза по окончании подходящего промежутка времени путем понижения pH добавлением подходящего реагента, например, уксусной кислоты (500 г/л $C_2H_4O_2$) или раствора цитрата (1 моль/л) с pH 3. Время гидролиза регулируют с целью достижения линейного характера образования хромофора во времени. Подходящими обычно являются периоды гидролиза от 3 до 15 минут, но допускаются и другие значения при условии получения таким образом лучшей линейности зависимости отклика от дозы.

Проверяют достоверность определения и вычисляют активность испытуемого препарата с использованием обычных статистических методов (например, *5.3. Статистический анализ результатов биологических испытаний и количественных определений*).

2.7.11. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФАКТОРА СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА IX

Активность определяют путем сравнения количества испытуемого препарата, необходимого для уменьшения времени свертывания испытуемой смеси, содержащей вещества, отличные от фактора IX, принимающие участие в процессе коагуляции, и количества препарата сравнения, калиброванного в Международных Единицах, которое требуется для получения такого же эффекта.

За Международную Единицу принимают активность установленного количества Международного Стандарта, состоящего из высушенного из замороженного состояния концентрата фактора свертывания крови человека IX. Эквивалентность Международного Стандарта в Международных Единицах устанавливается Всемирной организацией здравоохранения.

Восстанавливают по отдельности испытуемый препарат и препарат сравнения в соответствии с указаниями на этикетке и используют немедленно. В случае необходимости, определяют количество присутствующего гепарина (*2.7.12*) и нейтрализуют гепарин добавлением *протамина сульфата R* (10 мкг протамина сульфата нейтрализуют 1 МЕ гепарина). Испытуемый препарат и препарат сравнения разбавляют количеством *имидазольного буферного раствора pH 7,3 R*, достаточным для получения растворов с содержанием от 0,5 до 2,0 МЕ/мл. Готовят двукратные разведения в диапазоне от 1:10 до 1:80 с использованием смеси 1 объема раствора *натрия цитрата R* концентрацией 38 г/л и 5 объемов *имидазольного буферного раствора pH 7,3 R*. Разведения производят с высокой точностью и используют немедленно.

В определении могут использоваться, например, инкубационные пробирки, температура которых поддерживается с помощью водяной бани на уровне 37^{0}С. В каждую пробирку помещают по 0,1 мл *субстрата плазмы R2* и по 0,1 мл одного из разведений испытуемого препарата или препарата сравнения. К содержимому каждой пробирки добавляют по 0,1 мл подходящего разведения *цефалина R* или *заменителя тромбоцитов R* и 0,1 мл суспензии 0,5 г *легкого каолина R* в 100 мл раствора *натрия хлорида R* концентрацией 9 г/л. Пробирки выдерживают около 10 минут, время от времени переворачивая. К содержимому каждой пробирки добавляют по 0,1 мл раствора *кальция хлорида R* концентрацией 7,4 г/л. С использованием секундомера измеряют время коагуляции, т.е. интервал времени между добавлением хлорида кальция и первыми признаками образования фибрина, которые можно определять либо визуально, либо с применением соответствующей аппаратуры. Вычисляют активность с использованием обычных статистических методов (например, *5.3. Статистический анализ результатов биологических испытаний и количественных определений*).

Для подтверждения отсутствия в *субстрате плазмы R2* существенного количества фактора IX выполняют контрольный опыт с использованием вместо испытуемого препарата соответствующего количества смеси 1 объема раствора *натрия цитрата R* концентрацией 38 г/л и 5 объемов *имидазольного буферного раствора pH 7,3 R*. Результаты испытания считают достоверными, если время коагуляции в контрольном опыте составляет от 100 до 200 секунд.

2.7.12. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕПАРИНА В КОНЦЕНТРАТАХ ФАКТОРОВ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ

Гепарин определяют в виде комплекса с антитромбином III (АТ) по его способности к ингибированию фактора свертывания крови Xa (анти-Xa активность). В реакционной смеси поддерживают избыток АТ для обеспечения постоянной

концентрации комплекса гепарина с АТ. Фактор Ха нейтрализуется комплексом гепарина с АТ, а его избыток гидролизует специфический хромофорный пептидный субстрат с высвобождением хромофора. Количество хромофора обратно пропорционально активности гепарина.

Хромогенный субстрат фактора Ха. Специфический хромогенный субстрат для фактора Ха, например N-бензоил-L-изолейцил-L-глутамил-глицил-L-аргинина 4-нитроанилида гидрохлорид. Субстрат восстанавливают в соответствии с указаниями изготовителя.

Буфер для разведений. Раствор *трис-(гидроксиметил)-аминометана R* концентрацией 6,05 г/л. При необходимости доводят значение pH до 8,4 добавлением *хлористоводородной кислоты R*.

Испытуемый раствор. Испытуемый препарат разбавляют буфером для разведений, получая раствор с ожидаемым содержанием 0,1 МЕ/мл.

Стандартный раствор. Препарат сравнения разбавляют буфером для разведений, получая раствор с ожидаемым содержанием 0,1 МЕ/мл.

Нижеописанные условия определения относятся к титрационным микропланшетам. Если определение производят в пробирках, объемы могут изменяться при условии неизменности соотношений компонентов в смесях.

Перед началом испытания все растворы быстро нагревают на водяной бане до 37^{0}С.

В ряд ячеек распределяют по 20 мкл нормальной человеческой плазмы и по 20 мкл *раствора антитромбина III R1*. Добавляют в ячейки ряда 20, 60, 100 и 140 мкл испытуемого или стандартного раствора и доводят объемы в каждой из ячеек до 200 мкл с использованием буфера для разведений (содержание гепарина в конечной смеси 0,02–0,08 МЕ/мл).

Метод конечной точки. По 40 мл содержимого каждой из ячеек переносят во второй ряд ячеек, добавляют по 20 мкл *раствора бычьего фактора Ха R* и инкубируют при 37^{0}С в течение 30 секунд. Добавляют по 40 мкл раствора хромогенного субстрата фактора Ха концентрацией 1 ммоль/л и инкубируют при 37^{0}С в течение 3 минут. Реакцию прерывают путем снижения показателя pH добавлением походящего реагента, например, раствора *ледяной уксусной кислоты R* концентрацией 20 объемных процентов, и определяют оптическую плотность при длине волны 405 нм (*2.2.25*). Обычно подходящей является продолжительность реакции от 3 до 15 минут, но допускаются отклонения от этого интервала при условии получения лучшей линейности зависимости отклика от дозы.

Кинетический метод. По 40 мл содержимого каждой из ячеек переносят во второй ряд ячеек, добавляют по 20 мкл *раствора бычьего фактора Ха R* и инкубируют при 37^{0}С в течение 30 секунд. Добавляют по 40 мкл раствора хромогенного субстрата фактора Ха концентрацией 2 ммоль/л, инкубируют при 37^{0}С и регистрируют скорость расщепления субстрата путем постоянного измерения оптической плотности при длине волны 405 нм (*2.2.25*), определяя таким образом начальную скорость расщепления субстрата. Это значение должно находиться в линейной зависимости от остаточной концентрации фактора Ха.

Проверяют достоверность определения и вычисляют активность гепарина в испытуемом препарате с использованием обычных статистических методов, подходящих для анализа результатов измерения углов наклона (например, *5.3. Статистический анализ результатов биологических испытаний и количественных определений*).

2.7.13. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО АНТИ-D-ИММУНОГЛОБУЛИНА

МЕТОД А

Активность человеческого анти-D-иммуноглобулина определяют путем сравнения количества препарата, необходимого для агглютинации D-положительных эритроцитов с количеством препарата сравнения, калиброванного в Международных Единицах, необходимым для получения того же эффекта.

За Международную Единицу принимают активность установленного количества Международного Стандартного Образца. Эквивалентность Международного Стандартного Образца в Международных Единицах устанавливается Всемирной организацией здравоохранения.

Стандартный образец *человеческого анти-D-иммуноглобулина BRP* калиброван в Международных Единицах в сравнении с Международным Стандартом и предназначен для использования в количественных определениях человеческого анти-D-иммуноглобулина.

Используют пул D-положительных эритроцитов, собранных не более чем за 7 дней до испытания, хранившихся соответствующим образом и полученных не менее чем от четырех групп доноров с группой 0 R_1R_1. К подходящему объему клеток, предварительно трижды промытых раствором *натрия хлорида R* концентрацией 9 г/л, добавляют равный объем *раствора бромелайна R*, выдерживают при 37^{0}С в течение 10 минут, центрифугируют, отделяют супернатант и промывают трижды раствором *натрия хлорида R* концентрацией 9 г/л. 20 объемов эритроцитов суспендируют в смеси 15 объемов инертной сыворотки, 20 объемов раствора *бычьего альбумина R* концентрацией 300 г/л и 45 объемов раствора *натрия хлорида R* концентрацией 9 г/л. Полученную суспензию охлаждают ледяной водой при постоянном перемешивании.

С использованием калиброванного автоматического прибора для разведения и раствора для разведений, содержащего 5 г/л *бычьего альбумина R* и 9 г/л *натрия хлорида R,* готовят подходящие разведения испытуемого препарата и препарата сравнения.

Определение обычно проводят по изложенной ниже методике, используя соответствующий прибор для непрерывного автоматического гемолитического анализа. Температуру в трубопроводе, кроме инкубационных ячеек, поддерживают на уровне 15,0^{0}С. Вводят с помощью насоса в трубопровод аппарата суспензию эритроцитов со скоростью 0,1 мл/мин и раствор *метилцеллюлозы 450 R* концентрацией 3 г/л со скоростью 0,05 мл/мин. В течение 2 минут со скоростью 0,1 мл/мин вводят разведения испытуемого препарата и препарата сравнения. Перед введением очередного разведения вводят в течение 4 минут со скоростью 0,1 мл/мин раствор для разведений.

Вводят воздух со скоростью 0,6 мл/мин. Инкубируют при 37^{0}С в течение 18 минут, после чего рассеивают столбики эритроцитов путем введения со скоростью 1,6 мл/мин раствора *натрия хлорида R* концентрацией 9 г/л, содержащего подходящий увлажняющий агент (например, *полисорбат 20 R* в окончательной концентрации 0,2 г/л) для предотвращения разрушения аппликаций. После оседания агглютинатов дважды декантируют: вначале со скоростью 0,4 мл/мин, затем – со скоростью 0,6 мл/мин. Эритроциты, не подвергшиеся агглютинации, лизируют

раствором, содержащим 5 г/л *октоксинола 10 R*, 0,2 г/л *калия феррицианида R*, 1 г/л *натрия гидрокарбоната R* и 0,05 г/л *калия цианида R* и подаваемым со скоростью 2,5 мл/мин. Система включает петлю для получения десятиминутной задержки, необходимой для конверсии гемоглобина. Оптическую плотность (*2.2.25*) гемолизата регистрируют непрерывно при длине волны, выбранной в интервале от 540 до 550 нм. Определяют диапазон концентраций антител, на протяжении которого существует линейная зависимость между концентрацией и полученным изменением оптической плотности (ΔA). Исходя из полученных результатов, строят градуировочную кривую, участок линейности которой используют для определения активности испытуемого препарата.

Активность испытуемого препарата вычисляют с использованием обычных статистических методов (*5.3*).

МЕТОД В

Активность человеческого анти-D-иммуноглобулина определяют методом конкурентного твердофазного иммуноферментного анализа, производимого на титрационных микропланшетах, покрытых эритроцитами. Метод основан на конкурентном связывании между поликлональным препаратом анти-D-иммуноглобулина и биотинированными моноклональными анти-D-антителами, направленными против специфического эпитопа D-антигена. Активность испытуемого препарата сравнивают с препаратом сравнения, калиброванным в Международных Единицах.

За Международную Единицу принимают активность установленного количества Международного Стандартного Образца. Эквивалентность Международного Стандартного Образца в Международных Единицах устанавливается Всемирной организацией здравоохранения.

Стандартный образец *человеческого анти-D-иммуноглобулина BRP* калиброван в Международных Единицах в сравнении с Международным Стандартом и предназначен для использования в количественных определениях человеческого анти-D-иммуноглобулина.

МАТЕРИАЛЫ

Реагенты, для которых нет особых указаний, должны быть аналитической степени чистоты.

СФБ (раствор хлорида натрия в фосфатном буфере). 8,0 г *натрия хлорида R*, 0,76 г *безводного натрия гидрофосфата R*, 0,2 г *калия хлорида R*, 0,2 г *калия дигидрофосфата R* и 0,2 г *натрия азида R* растворяют в *воде R* и разбавляют до 1000 мл тем же растворителем.

СТБ (раствор хлорида натрия в трис-буфере). 8,0 г *натрия хлорида R* и 0,6 г *трис-(гидроксиметил)-аминометана R* растворяют в *воде R*. Доводят значение pH до 7,2 (*2.2.3*) с помощью *1 М хлористоводородной кислоты* и разбавляют до 1000 мл тем же растворителем.

Раствор папаина. Раствор готовят перемешиванием при 37^{0}С в течение 30 минут 1 г *папаина R* в 10 мл *0,067 М фосфатного буферного раствора pH 5,4 R*, центрифугированием при 10000 *g* в течение 5 минут и фильтрованием через мембрану с размером пор 0,22 мкм. Для активации смешивают 1 мл фильтрата, 1 мл раствора *L-цистеина R* концентрацией 48,44 г/л и 1 мл раствора *натрия эдетата R* концентрацией 3,72 г/л и разбавляют до 10 мл *0,067 М фосфатным буферным раствором pH 5,4 R*. Аликвоты замораживают при температуре –20^{0}С и ниже.

Эритроциты. Используют пул D-положительных эритроцитов, полученных не менее чем из трех групп доноров с группой 0 R_1R_1. Клетки промывают четырежды СФБ. Центрифугируют при 1800 *g* в течение 5 минут, смешивают подходящий объем предварительно нагретых упакованных клеток с подходящим объемом предварительно нагретого раствора папаина (объемное соотношение 2:1 было найдено подходящим) и инкубируют при 37^{0}С в течение 10 минут. Клетки промывают четырежды СФБ. Хранят при 4^{0}С с подходящим стабилизатором не более недели.

Биотинированный Brad-5. Используют в соответствии с инструкциями.

Щелочной авидин-стрептавидиновый реагент, связанный с фосфатазой. Предпочтительно использовать модифицированный реагент, сочетающий высокую специфическую активность с низким уровнем неспецифического связывания. Используют в соответствии с инструкциями.

Раствор субстрата. Используют в соответствии с инструкциями *пара*-нитрофенилфосфат.

Буфер для фиксации клеток. 18,02 г *глюкозы R*, 4,09 г *натрия хлорида R*, 1,24 г *борной кислоты R*, 10,29 г *натрия цитрата R* и 0,74 г *натрия эдетата R* растворяют в *воде R.* Доводят показатель рН (*2.2.3*) до 7,2–7,3 добавлением *1 М раствора натрия гидроксида* или *1 М хлористоводородной кислоты* и разбавляют *водой R* до 1000 мл. Хранят при температуре 4^{0}С. Используют непосредственно из места хранения.

Раствор глутарового альдегида. Непосредственно перед применением 90 мкл раствора *глутарового альдегида R* концентрацией 250 г/л добавляют к 24 мл холодного СФБ.

Титрационные микропланшеты. Планшеты, предназначенные для покрытия эритроцитами, представляют собой плоскодонные планшеты из полистирола со свойствами поверхности, оптимизированными для иммуноферментного анализа и с большой емкостью в отношении связывания с белками. Планшеты, используемые для приготовления разведений иммуноглобулина, представляют собой планшеты из полистирола или поливинилхлорида с U- или V-образными формами ячеек.

МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Готовят 0,1% (по объему) суспензию обработанных папаином эритроцитов в холодном буфере для фиксации клеток. В каждую ячейку плоскодонного титрационного микропланшета помешают по 50 мкл суспензии.

Планшет центрифугируют при 350 *g* в течение 3 минут, предпочтительно, при 4^{0}С. Не удаляя супернатант, к содержимому каждой из ячеек осторожно добавляют по 100 мкл раствора глутарового альдегида и выдерживают в течение 10 минут. Содержимое ячеек сливают путем быстрого переворачивания планшета и трижды промывают каждую ячейку 250–300 мкл СФБ. Эта операция может производиться либо вручную, либо с использованием автоматического устройства для промывания планшетов. Планшет либо используют в нижеописанном испытании, либо после сливания СФБ, добавления в каждую ячейку 100 мкл буфера для фиксации клеток и запечатывания пластиковой пленкой хранят при 4^{0}С не более 1 месяца.

Испытуемые растворы. В случае лиофильно высушенных препаратов их восстанавливают в соответствии с указаниями на этикетке. Готовят в четырех независимых повторностях 5 серийных двукратных разведений, начиная с концентрации 30 МЕ/мл с использованием СФБ, содержащего 10 г/л *бычьего альбумина R*. При необходимости, исходное разведение корректируют с целью

получения откликов, попадающих в область линейности графика зависимости отклика от дозы.

Растворы сравнения. Восстанавливают препарат сравнения в соответствии с указаниями на этикетке. Готовят в четырех независимых повторностях 5 серийных двукратных разведений, начиная с концентрации 30 МЕ/мл с использованием СФБ, содержащего 10 г/л *бычьего альбумина R*.

В ячейки каждого из рядов титрационного микропланшета с U- или V-образными формами ячеек вносят по 35 мкл каждого из разведений испытуемого раствора или раствора сравнения. К содержимому каждой из ячеек добавляют по 35 мкл биотинированного Brad-5 с содержанием 250 нг/мл.

Освобождают ячейки планшета, покрытого эритроцитами, путем переворачивания и высушивания бумажным полотенцем. Добавляют по 250 мкл СФБ, содержащего 20 г/л *бычьего альбумина R* и оставляют при комнатной температуре на 30 минут.

Освобождают ячейки планшета, покрытого эритроцитами, путем переворачивания и высушивания бумажным полотенцем и помещают в каждую из ячеек по 50 мкл каждого из разведений испытуемого раствора и раствора сравнения, содержащих биотинированный Brad-5. 50 мкл СФБ, содержащего 10 г/л *бычьего альбумина R*, используют в качестве отрицательного контроля. Планшет запечатывают пластиковой пленкой и инкубируют при комнатной температуре в течение 1 часа.

Удаляют жидкость из ячеек планшета, покрытого эритроцитами, и трижды промывают каждую ячейку 250–300 мкл СТБ.

Щелочной авидин-стрептавидиновый реагент, связанный с фосфатазой, разбавляют СТБ, содержащим 10 г/л *бычьего альбумина R* и добавляют в количестве по 50 мкл в каждую из ячеек. Инкубируют в течение 30 минут при комнатной температуре.

Удаляют жидкость из ячеек планшета, покрытого эритроцитами, и трижды промывают каждую ячейку 250–300 мкл СТБ.

В каждую из ячеек добавляют по 100 мкл раствора субстрата и инкубируют в темноте при комнатной температуре в течение 10 минут. Для остановки реакции в каждую из ячеек добавляют по 50 мкл *3 М раствора натрия гидроксида*.

Измеряют значения оптической плотности при длине волны 405 нм и вычитают значение, полученное для отрицательного контроля. Значения оптической плотности в области линейности кривой титрования используют для оценки активности испытуемого препарата с использованием обычных статистических методов (*5.3*).

МЕТОД С

Активность человеческого анти-D-иммуноглобулина определяют методом поточной цитометрии в формате титрационного микропланшета. Метод основан на специфическом связывании между анти-D-иммуноглобулином и D-положительными эритроцитами. Активность испытуемого препарата сравнивают с препаратом сравнения, калиброванным в Международных Единицах.

За Международную Единицу принимают активность установленного количества Международного Стандартного Образца. Эквивалентность Международного Стандартного Образца в Международных Единицах устанавливается Всемирной организацией здравоохранения.

Стандартный образец *человеческого анти-D-иммуноглобулина BRP* калиброван в Международных Единицах в сравнении с Международным Стандартом и предназначен для использования в количественных определениях человеческого анти-D-иммуноглобулина.

МАТЕРИАЛЫ

Реагенты, для которых нет особых указаний, должны быть аналитической степени чистоты.

СФБ. 8,0 г *натрия хлорида R*, 0,76 г *безводного натрия гидрофосфата R*, 0,2 г *калия хлорида R*, 0,2 г *калия дигидрофосфата R* и 0,2 г *натрия азида R* растворяют в *воде R* и разбавляют до 1000 мл тем же растворителем.

Раствор СФБ-БСА. СФБ, содержащий 10,0 г/л *бычьего альбумина R*.

Эритроциты. Используют D-положительные эритроциты, полученные из группы доноров с группой 0 R_1R_1 не более, чем за две недели до определения. При необходимости хранят с соответствующим стабилизатором при 4^0C. Клетки промывают не менее двух раз раствором СФБ-БСА и готовят суспензию, содержащую 1×10^4, но не более 5×10^4 клеток в микролитре с использованием раствора СФБ-БСА.

Используют D-отрицательные эритроциты, полученные из группы доноров с группой 0 rr и подготовленные аналогичным образом.

Вторичные антитела. Используют подходящий фрагмент анти-IgG-антитела, связанный с флуоресцентным красителем, обладающий специфичностью в отношении человеческого IgG или его частей. Хранят и используют в соответствии с инструкциями изготовителя.

Титрационные микропланшеты. Используют плоскодонные планшеты без поверхностной обработки для иммуноферментного анализа.

МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Испытуемые растворы. В случае лиофильно высушенных препаратов их восстанавливают в соответствии с указаниями на этикетке. Готовят не менее чем в трех независимых повторностях не менее трех серийных полутора- или двукратных разведений, начиная с концентрации в диапазоне 1,2–0,15 МЕ/мл с использованием раствора СФБ-БСА. При необходимости, исходное разведение корректируют с целью получения откликов, попадающих в область линейности графика зависимости отклика от дозы.

Растворы сравнения. Восстанавливают препарат сравнения в соответствии с указаниями на этикетке. Готовят не менее чем в трех независимых повторностях не менее трех серийных полутора- или двукратных разведений, начиная с концентрации в диапазоне 1,2–0,15 МЕ/мл с использованием раствора СФБ-БСА. При необходимости, исходное разведение корректируют с целью получения откликов, попадающих в область линейности графика зависимости отклика от дозы.

В каждую ячейку титрационного микропланшета распределяют по 50 мкл D-положительных эритроцитов. К содержимому ячеек каждого ряда добавляют по 50 мкл каждого из разведений испытуемого раствора или раствора сравнения. Используют 50 мкл раствора СФБ-БСА в качестве отрицательного контроля. По 50 мкл D-отрицательных эритроцитов распределяют в четыре ячейки того же микропланшета и добавляют по 50 мкл наименьшего разведения испытуемого препарата. Для отслеживания ложных реакций распределяют по 50 мкл D-положительных эритроцитов в четыре ячейки того же микропланшета и добавляют

по 50 мкл раствора СФБ-БСА. Запечатывают пластиковой пленкой и инкубируют при 37^{0}С в течение 40 минут.

Планшеты центрифугируют при 50 *g* в течение 3 минут, отбрасывают супернатант и промывают ячейки 200-250 мкл раствора СФБ-БСА. Повторяют промывку еще не менее одного раза.

Планшеты центрифугируют при 50 *g* в течение 3 минут, отбрасывают супернатант и добавляют по 50 мкл вторичного антитела, разбавленного раствором СФБ-БСА до подходящей концентрации белка. Запечатывают пластиковой пленкой и инкубируют при комнатной температуре в защищенном от света месте в течение 20 минут.

Планшеты центрифугируют при 50 *g* в течение 3 минут, отбрасывают супернатант и промывают ячейки 200-250 мкл раствора СФБ-БСА. Повторяют промывку еще не менее одного раза.

Планшеты центрифугируют при 50 *g* в течение 3 минут, клетки ресуспендируют в 200-250 мкл раствора СФБ-БСА.

Суспензию клеток переносят в трубку, совместимую с имеющимся оборудованием для поточной цитометрии, и проводят дальнейшее разбавление добавлением СФБ для обеспечения подходящей скорости потока.

Немедленно приступают к измерению медианной интенсивности флуоресценции в поточном цитометре. Регистрируют не менее 10000 событий без гейтинга, но с исключением шумов.

С использованием медианной интенсивности флуоресценции в области линейности кривой зависимости отклика от дозы оценивают активность испытуемого препарата обычными статистическими методами (*5.3*).

2.7.14. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИГЕННОЙ (ИММУНОГЕННОЙ) АКТИВНОСТИ ВАКЦИНЫ ГЕПАТИТА А

Количественное определение вакцины гепатита А производят либо *in vivo*, путем сравнения ее способности приводить в данных условиях к образованию специфических антител у мышей с такой же способностью препарата сравнения, либо *in vitro*, путем иммунохимического определения содержания антигена.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ *IN VIVO*

Испытание на мышах, описанное ниже, приводится в качестве примера подходящего для данной вакцины метода; могут использоваться и другие методы с подтвержденной достоверностью.

Выбор и распределение испытуемых животных. В испытании используют здоровых мышей подходящей линии из одной партии, возрастом около 5 недель. Используют животных одного пола. Животных делят не менее чем на семь равных групп; количество мышей в группе должно быть подходящим для выполнения требований испытания.

Определение антигенной активности испытуемой вакцины. Готовят не менее трех серийных разведений испытуемой вакцины и соответствующие разведения препарата сравнения с использованием раствора *натрия хлорида R* концентрацией 9 г/л, содержащего алюминийсодержащий адъювант, используемый в вакцине. Каждое разведение назначают одной из групп мышей, каждой из которых

вводят подкожно не более 1,0 мл этого разведения. Контрольной невакцинированной группе вводят подкожно такой же объем раствора *натрия хлорида R* концентрацией 9 г/л, содержащего адъювант, используемый в вакцине. Через 28–32 дня всех животных анестезируют и производят забор крови. Индивидуальные сыворотки хранят отдельно друг от друга. Выполняют количественное определение специфических антител к вирусу гепатита А в индивидуальных сыворотках, используя подходящий иммунохимический метод (*2.7.1*).

Вычисления. Вычисления проводят обычными статистическими методами, используемыми для количественных определений с конечным числом возможных результатов (*5.3*).

Из распределения уровней реакции, измеренных для всех сывороток группы невакцинированных животных определяют максимальный ожидаемый уровень реакции невакцинированного животного в данном количественном определении. При получении отклика, превышающего этот уровень, у вакцинированного животного, его по определению считают результатом сероконверсии.

Производят подходящее преобразование (например, пробит-преобразование) процентной численности животных с обнаруженной сероконверсией в каждой из групп и анализируют данные в соответствии с моделью параллельных линий логарифмической зависимости дозы от отклика. Активность препарата определяют относительно препарата сравнения.

Условия достоверности. Результаты испытания являются достоверными, если:

- как для испытуемой вакцины, так и для препарата сравнения, ED_{50} заключена в интервале между наибольшей и наименьшей дозами препарата, введенными животным,

- при статистическом анализе не выявляется отклонений от линейности и параллельности,

- границы доверительного интервала относительной активности находятся между 33% и 300% от оцененного значения активности.

Требования к активности. Верхняя граница доверительного интервала (P = 0,95) оцениваемой относительной активности должна быть не менее 1,0.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ *IN VITRO*

Выполняют иммунохимическое определение (*2.7.1*) содержания антигена с критериями приемлемости, валидированными в сравнении с испытанием *in vivo*. Критерии приемлемости для данного препарата сравнения подлежат утверждению компетентными органами с учетом данных валидации.

2.7.15. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВАКЦИНЫ ГЕПАТИТА В (RDNA)

Количественное определение вакцины гепатита В (rDNA) производят либо *in vivo*, путем сравнения ее способности приводить в данных условиях к образованию специфических антител против поверхностного антигена гепатита В (HbsAg) у мышей или морских свинок с такой же способностью препарата сравнения, либо *in vitro*, путем иммунохимического определения содержания антигена.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ *IN VIVO*

Выбор и распределение испытуемых животных. В испытании используют здоровых мышей из одной партии, возрастом около 5 недель. Используемая в данном испытании линия мышей должна обеспечивать получение существенного уклона кривой зависимости отклика от дозы в отношении антигена; подходящими являются мыши гаплотипов $H\text{-}2^q$ и $H\text{-}2^d$. Также могут использоваться здоровые морские свинки из одной партии с массой тела от 300 до 350 г и возрастом около 7 недель. Используют животных одного пола. Животных делят не менее чем на семь равных групп; количество в группе должно быть подходящим для выполнения требований испытания.

Определение активности испытуемой вакцины. Готовят не менее трех серийных разведений испытуемой вакцины и соответствующие разведения препарата сравнения с использованием раствора *натрия хлорида R* концентрацией 9 г/л с добавлением алюминийсодержащего адъюванта, используемого в вакцине, или другого подходящего растворителя. Каждое из полученных разведений назначают одной из групп животных, каждому из которых вводят внутрибрюшинно не более 1,0 мл этого разведения. Одну группу животных не вакцинируют, а вводят внутрибрюшинно такой же объем растворителя. Через подходящий промежуток времени (например, от 4 до 6 недель) всех животных анестезируют и производят забор крови. Индивидуальные сыворотки хранят отдельно друг от друга. Выполняют количественное определение специфических антител против HBsAg в индивидуальных сыворотках, используя подходящий иммунохимический метод (*2.7.1*).

Вычисления. Вычисления проводят обычными статистическими методами, используемыми для количественных определений с конечным числом возможных результатов (*5.3*).

Из распределения уровней реакции, измеренных для всех сывороток группы невакцинированных животных, определяют максимальный ожидаемый уровень реакции невакцинированного животного в данном количественном определении. При получении отклика, превышающего этот уровень, у вакцинированного животного, его по определению считают результатом сероконверсии.

Производят подходящее преобразование (например, пробит-преобразование) процентной численности животных с обнаруженной сероконверсией в каждой из групп и анализируют данные в соответствии с моделью параллельных линий логарифмической зависимости дозы от отклика. Активность препарата определяют относительно активности препарата сравнения.

Условия достоверности. Результаты испытания являются достоверными, если:

- как для испытуемой вакцины, так и для препарата сравнения, ED_{50} заключена в интервале между наибольшей и наименьшей дозами препарата, введенными животным,

- при статистическом анализе не выявляется отклонений от линейности и параллельности,

- границы доверительного интервала относительной активности находятся между 33% и 300% от оцененного значения активности.

Требования к активности. Верхняя граница доверительного интервала (P = 0,95) оцениваемой относительной активности должна быть не менее 1,0.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ *IN VITRO*

Выполняют иммунохимическое определение (*2.7.1*) содержания антигена с критериями приемлемости, валидированными в сравнении с испытанием *in vivo*.

Показано, что методы твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) и радиоиммунологического анализа (РИА) с использованием моноклональных антител, специфичных к индуцирующим защитную реакцию эпитопам HBsAg являются подходящими. Используют соответствующее число разведений испытуемой вакцины и препарата сравнения. Полученные данные, которые могут быть подвергнуты преобразованию, анализируют методом параллельных линий. Наборы для оценки HBsAg *in vitro* являются коммерчески доступными, и возможна адаптация методов их использования для определения активности *in vitro.*

Критерии приемлемости для данного препарата сравнения подлежат утверждению компетентными органами с учетом данных валидации.

2.7.16. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВАКЦИНЫ КОКЛЮША (БЕСКЛЕТОЧНОЙ)

Способность вакцины вызывать образование специфических антител сравнивают с аналогичным свойством параллельно испытываемого препарата сравнения; антитела определяют с использованием подходящего иммунохимического метода (*2.7.1*), например, твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA). В приведенном ниже описании испытания на мышах используется трехточечная модель, однако, после валидации, для рутинных испытаний может быть использован метод однократного разведения.

Вакцина сравнения. В качестве вакцины сравнения используют партию вакцины, эффективность которой показана клиническими испытаниями, или репрезентативную партию этой вакцины. Для приготовления репрезентативной партии необходимо строгое соблюдение технологического процесса при производстве партии, подвергающейся клиническим испытаниям. Стабильность вакцины сравнения должна быть документально подтверждена.

Требования. Способность вакцины вызывать образование антител не должна быть существенно ниже (P = 0,95) по сравнению с аналогичным свойством препарата сравнения.

Следующая модель испытания приводится в качестве примера метода, пригодность которого для данного испытания подтверждена.

Отбор и распределение испытуемых животных. В испытании используют здоровых мышей (например, линии CD1) из одной партии возрастом от 4 до 8 недель. Животных распределяют по шести группам, состоящим из количества особей, достаточного для выполнения требований испытания. Используют три разведения испытуемой вакцины и три разведения препарата сравнения и назначают каждой из групп одно из разведений. Каждому животному внутрибрюшинно или подкожно вводят по 0,5 мл разведения, которое было назначено группе, к которой данное животное относится.

Отбор образцов сыворотки. Через 4–5 недель после вакцинации проводят забор крови у мышей под анестезией. Сыворотки до определения содержания антител хранят при –20^{0}С.

Определение антител. Выполняют количественное определение содержания специфических в отношении каждого из компонентов антител в сыворотках с

использованием метода с подтвержденной достоверностью, например, ELISA, методика которого приведена ниже.

Испытание ELISA. Титрационные микропланшеты, выполненные из поливинилхлорида или полистирола, в соответствии с требованиями специфического антигена, покрывают очищенным антигеном в концентрации 100 нг на одну ячейку. После промывки непрореагировавшие участки блокируют путем инкубации с раствором бычьего сывороточного альбумина и последующей промывки. Производят на планшетах двукратные разведения сывороток мышей, иммунизированных испытуемой вакциной и вакциной сравнения. После инкубации при 22–25^{0}С в течение 1 часа планшеты промывают. После промывки добавляют хромогенный субстрат, высвобождающий под воздействием присоединенного ферментного конъюгата хромофор, который может быть количественно определен путем измерения оптической плотности (*2.2.25*). Выбирают такие условия испытания, чтобы в рабочем диапазоне измерений имелась линейная зависимость оптической плотности от содержания антител, а значения оптической плотности находились в пределах от 0,1 до 2,0.

В испытании используется контрольная антисыворотка установленной активности, служащая основанием для вычисления содержания антител в испытуемой сыворотке. Также в испытании используется стандартизированная контрольная сыворотка.

Результаты испытания являются недостоверными, если:

- значение, определенное для контрольной сыворотки, отличается от приписанной величины более чем на удвоенное значение стандартного отклонения,
- доверительный интервал оценочного значения активности шире, чем от 50 до 200%.

Вычисления. Вычисляют титры антител в сыворотках мышей, иммунизированных испытуемой вакциной и препаратом сравнения, и из полученных значений с использованием обычных статистических методов определяют активность испытуемой вакцины относительно вакцины сравнения.

2.7.17. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИТРОМБИНА III ЧЕЛОВЕКА

Содержание антитромбина III в испытуемом препарате определяют путем сравнения его способности к инактивации тромбина в присутствии избыточного количества гепарина с такой же способностью препарата сравнения антитромбина III человека, калиброванного в Международных Единицах. Различные количества испытуемого препарата смешивают с определенным количеством тромбина и определяют активность остаточного количества тромбина с использованием подходящего хромогенного субстрата.

За Международную Единицу принимают активность установленного количества Международного Стандарта концентрата антитромбина III человека. Эквивалентность Международного Стандарта в Международных Единицах устанавливается Всемирной организацией здравоохранения.

Методика определения. Готовят два независимых ряда из трех или четырех разведений испытуемого препарата и препарата сравнения в диапазоне от 1/75 до 1/200 исходя из концентрации 1 МЕ/мл с использованием *буферного раствора tris-EDTA BSA pH 8,4 R*, содержащего 15 МЕ гепарина в миллилитре.

По 200 мкл каждого из разбавлений выдерживают при 37^{0}С в течение 1–2 минут. К каждому разведению добавляют по 200 мкл раствора *бычьего тромбина R* с содержанием 2 МЕ/мл в *буферном растворе tris-EDTA BSA pH 8,4 R*, перемешивают и выдерживают при 37^{0}С в течение в точности 1 минуты. Добавляют 500 мкл подходящего хромогенного субстрата (например, D-фенилаланил-L-пипеколил-L-аргинина 4-нитроанилида, растворенного в *воде R* с получением раствора, содержащего 4 ммоль/л и дополнительно разбавленного до концентрации, подходящей для проведения количественного определения с использованием *буферного раствора tris-EDTA BSA pH 8,4 R* без добавления альбумина). Тотчас же начинают фиксировать изменение оптической плотности при длине волны 405 нм (*2.2.25*), и продолжают измерение в течение не менее 30 секунд. Вычисляют скорость изменения оптической плотности (ΔА/мин). (Определение также может производиться методом конечной точки путем прерывания реакции добавлением уксусной кислоты и измерением оптической плотности при длине волны 405 нм.)

Скорость изменения оптической плотности (ΔА/мин) обратно пропорциональна активности антитромбина III.

Проверяют достоверность определения и вычисляют активность испытуемого препарата с использованием обычных статистических методов (например, *5.3. Статистический анализ результатов биологических испытаний и количественных определений*).

2.7.18. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФАКТОРА СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ II

Количественное определение фактора свертывания крови II производят по его специфической активации с образованием фактора IIa. Фактор IIa оценивают на основании сопоставления его активности по расщеплению специфического хромогенного пептидного субстрата с такой же активностью Международного Стандарта или препарата сравнения, калиброванного в Международных Единицах.

За Международную Единицу принимают активность фактора II в установленном количестве Международного Стандарта, состоящего из высушенного из замороженного состояния концентрата человеческого фактора свертывания крови II. Эквивалентность Международного Стандарта в Международных Единицах устанавливается Всемирной организацией здравоохранения.

Хромогенный метод количественного определения включает две последовательные стадии: индуцируемая змеиным ядом активация фактора II и ферментативное расщепление хромогенного субстрата фактором IIa с образованием хромофора, который определяют спектрофотометрически. В соответствующих условиях испытания существует линейная зависимость между активностью фактора IIa и расщеплением хромогенного субстрата.

РЕАГЕНТЫ

Специфический активатор фактора II из яда эфы (Экарин). Белок, получаемый из яда эфы (*Echis carinatus*), специфически активирующий фактор II. Восстанавливают в соответствии с инструкциями производителя. Восстановленный препарат хранят при 4^{0}С и используют в течение 1 месяца.

Хромогенный субстрат фактора IIa. Специфический хромогенный субстрат для фактора IIa, например: *H*-D-фенилаланил-L-пипеколил-L-аргинина 4-нитроанилида дигидрохлорид, 4-толуолсульфонил-глицил-пролил-L-аргинина 4-

нитроанилид, *H*-D-циклогексилглицил-α-аминобутирил-L-аргинина 4-нитроанилид, D-циклогексилглицил-L-аланил-L-аргинина 4-нитроанилида диацетат. Восстанавливают в соответствии с инструкциями изготовителя.

Буфер для разведений. Раствор, содержащий 6,06 г/л *трис-(гидроксиметил)-аминометана R*, 17,53 г/л *натрия хлорида R*, 2,79 г/л *(этилендинитрило)-тетрауксусной кислоты R* и 1 г/л *бычьего альбумина R* или *человеческого альбумина R*. При необходимости доводят значение pH до 8,4 с использованием *хлористоводородной кислоты R*.

МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Испытуемый раствор. Испытуемый препарат разбавляют буфером для разведений, получая раствор с содержанием 0,015 МЕ фактора II в миллилитре. Готовят не менее трех дальнейших разведений с использованием того же буфера.

Раствор сравнения. Препарат сравнения разбавляют буфером для разведений, получая раствор с содержанием 0,015 МЕ фактора II в миллилитре. Готовят не менее трех дальнейших разведений с использованием того же буфера.

Все растворы перед испытанием нагревают на водяной бане до 37^0C.

Нижеописанные условия определения относятся к титрационным микропланшетам. Если определение производят в пробирках, объемы могут изменяться при условии неизменности соотношений компонентов в смесях.

Определение выполняют с использованием титрационного микропланшета, поддерживаемого при 37^0C. По 25 мкл каждого из разведений испытуемого раствора или раствора сравнения вносят в каждый из рядов ячеек. К содержимому каждой ячейки добавляют 125 мкл буфера для разведений, затем 25 мкл экарина и инкубируют в точности 2 минуты. К содержимому каждой ячейки добавляют 25 мкл хромогенного субстрата фактора IIa.

Регистрируют скорость изменения оптической плотности (*2.2.25*) при длине волны 405 нм непрерывно в течение 3 минут и получают среднюю скорость изменения оптической плотности (ΔA/мин). При невозможности непрерывной регистрации, оптическую плотность при 405 нм регистрируют с подходящими последовательными интервалами, например, продолжительностью 40 секунд, строят на миллиметровой бумаге график зависимости оптической плотности от времени и вычисляют из уклона полученной прямой значение ΔA/мин. Из значений ΔA/мин для каждого разведения испытуемого препарата и препарата сравнения вычисляют активность испытуемого препарата и проверяют достоверность определения с использованием обычных статистических методов (*5.3*).

2.7.19. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФАКТОРА СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ X

Количественное определение фактора свертывания крови X производят по его специфической активации с образованием фактора Xa. Фактор Xa оценивают на основании его активности по расщеплению специфического хромогенного пептидного субстрата с такой же активностью Международного Стандарта или препарата сравнения, калиброванного в Международных Единицах.

За Международную Единицу принимают активность фактора X в установленном количестве Международного Стандарта, состоящего из высушенного из замороженного состояния концентрата человеческого фактора свертывания крови X. Эквивалентность Международного Стандарта в Международных Единицах устанавливается Всемирной организацией здравоохранения.

Хромогенный метод количественного определения включает две последовательные стадии: индуцируемая змеиным ядом активация фактора X и ферментативное расщепление хромогенного субстрата фактором Xa с образованием хромофора, который определяют спектрофотометрически. В соответствующих условиях испытания существует линейная зависимость между активностью фактора Xa и расщеплением хромогенного субстрата.

РЕАГЕНТЫ

Специфический активатор фактора X из яда цепочной гадюки (RVV). Белок, полученный из яда цепочной гадюки (*Vipera russelli*), который специфически активирует фактор X. Восстанавливают в соответствии с инструкциями производителя. Восстановленный препарат хранят при 4^{0}С и используют в течение 1 месяца.

Хромогенный субстрат фактора Xa. Специфический хромогенный субстрат для фактора Xa, например: *N*-α-бензилоксикарбонил-D-аргинил-L-глицил-L-аргинина 4-нитроанилида дигидрохлорид, *N*-бензоил-L-изолейцил-L-глутамил-глицил-L-аргинина 4-нитроанилида гидрохлорид, метансульфонил-D-лейцил-глицил-L-аргинина 4-нитроанилид, метоксикарбонил-D-циклогексилаланил-глицил-L-аргинина 4-нитроанилида ацетат. Восстанавливают в соответствии с инструкциями изготовителя.

Буфер для разведений. Раствор, содержащий 3,7 г/л *трис-(гидроксиметил)-аминометана R*, 2,1 г/л *имидазола R*, 0,02 г/л *гексадиметрина бромида R* и 1 г/л *бычьего альбумина R* или *человеческого альбумина R*. При необходимости доводят значение pH до 8,4 с использованием *хлористоводородной кислоты R*.

МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Испытуемый раствор. Испытуемый препарат разбавляют буфером для разведений, получая раствор с содержанием 0,18 МЕ фактора X в миллилитре. Готовят не менее трех дальнейших разведений с использованием того же буфера.

Раствор сравнения. Препарат сравнения разбавляют буфером для разведений, получая раствор с содержанием 0,18 МЕ фактора X в миллилитре. Готовят не менее трех дальнейших разведений с использованием того же буфера.

Все растворы перед испытанием быстро нагревают на водяной бане до 37^{0}С.

Нижеописанные условия определения относятся к титрационным микропланшетам. Если определение производят в пробирках, объемы могут изменяться при условии неизменности соотношений компонентов в смесях.

Определение выполняют с использованием титрационного микропланшета, поддерживаемого при 37^{0}С. По 12,5 мкл каждого из разведений испытуемого раствора или раствора сравнения вносят в каждый из рядов ячеек. К содержимому каждой ячейки добавляют 25 мкл RVV и инкубируют в точности 90 секунд. К содержимому каждой ячейки добавляют 150 мкл хромогенного субстрата фактора Xa, разбавленного в соотношении 1:6 буфером для разведений.

Регистрируют скорость изменения оптической плотности (*2.2.25*) при длине волны 405 нм непрерывно в течение 3 минут и получают среднюю скорость

изменения оптической плотности (ΔА/мин). При невозможности непрерывной регистрации, оптическую плотность при 405 нм регистрируют с подходящими последовательными интервалами, например, продолжительностью 40 секунд, строят на миллиметровой бумаге график зависимости оптической плотности от времени и вычисляют из уклона полученной прямой значение ΔА/мин. Из значений ΔА/мин для каждого разведения испытуемого препарата и препарата сравнения вычисляют активность испытуемого препарата и проверяют достоверность определения с использованием обычных статистических методов (*5.3*).

2.7.20. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНАКТИВИРОВАННОЙ ВАКЦИНЫ ПОЛИОМИЕЛИТА *IN VIVO*

Способность вакцины вызывать образование нейтрализующих антител определяют *in vivo* по одному из следующих методов.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЦЫПЛЯТ ИЛИ МОРСКИХ СВИНОК

Готовят подходящий ряд, состоящий не менее чем из трех разведений испытуемой вакцины с использованием подходящего буферизированного раствора хлорида натрия. Морских свинок массой тела 250–350 г или цыплят возрастом 3 недели распределяют по группам, состоящим из 10 особей, и назначают каждой из групп одно из разведений вакцины. Каждому животному внутримышечно вводят по 0,5 мл разведения, которое было назначено группе, к которой данное животное относится. Через 5-6 дней проводят забор крови и отделяют сыворотки. Определяют наличие в разведениях сывороток (1:4) нейтрализующих антител к каждому из человеческих полиовирусов: 1, 2 и 3. 100 $CCID_{50}$ вируса смешивают с разведением сыворотки и инкубируют при 37^{0}С в течение 4,5–6 часов. Хранят при 5 ± 3^{0}С в течение 12–18 часов. Смеси прививают клеточным культурам для определения присутствия вирусов, не подвергшихся нейтрализации, и ведут регистрацию результатов в течение периода до 7 дней после инокуляции. Для каждой группы животных отмечают количество сывороток, в которых обнаружено наличие нейтрализующих антител, и вычисляют разведение вакцины, дающее такой отклик у 50% животных. Параллельно выполняют контрольный опыт с использованием подходящего препарата сравнения. Вакцина выдерживает испытание, если обнаруживается наличие нейтрализующих антител к каждому из трех типов вируса у 50% животных в разведении вакцины в соотношении 1:100 или более.

ИСПЫТАНИЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КРЫС.

Метод количественного определения *in vivo* состоит из внутримышечного введения в задние конечности не менее трех разведений испытуемой вакцины и вакцины сравнения с использованием для каждого разведения группы из 10 крыс подходящей линии, не содержащих патогенов. Для получения достоверных результатов для всех серотипов часто бывает необходимо использовать четыре разведения. Количество животных в группе должно быть достаточным для получения результатов, отвечающих критериям достоверности; десяти крыс в группе обычно достаточно, хотя достоверные результаты могут быть получены и с меньшим числом животных в группе. Масса тела животного не должна отличаться более, чем на 10% от средней по группе. Каждой крысе вводят по 0,5 мл материала. Диапазон доз выбирают таким образом, чтобы получить дозовый отклик для всех трех типов полиовируса. Забор крови у животных производят через 20–22 дня.

Определяют по отдельности нейтрализующие титры против всех трех типов полиовируса с использованием в качестве провокационных вирусов 100 $CCID_{50}$ штаммов Sabin, в качестве индикаторных клеток – Vero или Hep2 в условиях нейтрализации, состоящих в инкубации в течение трех часов при 35–37^{0}С и 18 часов при 2–8^{0}С. Для получения результатов производят фиксацию и окрашивание после семидневной инкубации при 35^{0}С. Для признания определения достоверным необходимо показать, что титр провокационных вирусов находится в пределах от 10 до 1000 $CCID_{50}$, а титр нейтрализующих антител в контрольной сыворотке должен находиться в пределах двух двукратных разведений среднего геометрического титра сыворотки. Активность вакцины вычисляют путем сопоставления количества респондеров на испытуемую вакцину и вакцину сравнения. Анализ выполняют с использованием пробит-метода или, после проверки достоверности, метода параллельных линий. В случае пробит-метода для определения респондера необходимо установить граничный титр нейтрализующих антител для каждого из типов полиовируса. В связи с изменчивостью результатов в разных лабораториях, определить общепринятые граничные значения не представляется возможным. Вместо этого граничные значения определяют в каждой лаборатории, основываясь не менее, чем на трех результатах испытаний вакцины сравнения. За граничное значение принимают среднюю точку в шкале log2 минимального и максимального значений среднего геометрического титров, вычисленных для ряда из трех или более испытаний. Для каждого из трех типов полиовируса активность вакцины не должна быть существенно ниже такой же активности препарата сравнения. Результаты испытания являются достоверными, если:

- как для испытуемой вакцины, так и для препарата сравнения, ED_{50} заключена в интервале между наибольшей и наименьшей дозами препарата, введенными животным,

- при статистическом анализе не выявляется отклонений от линейности и параллельности,

- границы доверительного интервала относительной активности находятся между 25% и 400% от оцененного значения активности.

2.7.22. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФАКТОРА СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА XI

Активность фактора свертывания крови человека XI определяют путем сравнения количества испытуемого препарата, необходимого для уменьшения времени свертывания испытуемой смеси, содержащей вещества, отличные от фактора XI, принимающие участие в процессе коагуляции крови, и количества нормальной человеческой плазмы, которое требуется для получения такого же эффекта. 1 единица фактора XI равна активности 1 мл нормальной человеческой плазмы.

Восстанавливают по отдельности испытуемый препарат и препарат сравнения в соответствии с указаниями на этикетке и используют немедленно. В случае необходимости, определяют количество присутствующего гепарина (*2.7.12*) и нейтрализуют гепарин добавлением *протамина сульфата R* (10 мкг протамина сульфата нейтрализуют 1 МЕ гепарина). Испытуемый препарат и препарат сравнения разбавляют количеством *имидазольного буферного раствора pH 7,3 R*, содержащего 1% альбумина, достаточным для получения растворов с содержанием от 0,5 до 2,0 единиц в миллилитре. Готовят двукратные разведения в диапазоне от

1:10 до 1:80 с использованием *имидазольного буферного раствора pH 7,3 R*. Разведения производят с высокой точностью и используют немедленно.

В определении могут использоваться, например, инкубационные пробирки, температура которых поддерживается с помощью водяной бани на уровне 37^{0}С. В каждую пробирку помещают по 0,1 мл *субстрата плазмы R3* и по 0,1 мл одного из разведений испытуемого препарата или препарата сравнения. К содержимому каждой пробирки добавляют по 0,1 мл подходящего разведения *цефалина R* или *заменителя тромбоцитов R* и 0,1 мл суспензии 0,5 г *легкого каолина R* в 100 мл раствора *натрия хлорида R* концентрацией 3,7 г/л. Пробирки выдерживают около 10 минут, время от времени переворачивая. К содержимому каждой пробирки добавляют по 0,1 мл раствора *хлорида кальция R* концентрацией 7,4 г/л. С использованием таймера измеряют время коагуляции, т.е. интервал времени между добавлением хлорида кальция и первыми признаками образования фибрина, которые можно определять либо визуально, либо с применением соответствующей аппаратуры. Вычисляют активность с использованием обычных статистических методов (например, *5.3. Статистический анализ результатов биологических испытаний и количественных определений*).

Для подтверждения отсутствия в *субстрате плазмы R3* существенного количества фактора XI выполняют контрольный опыт с использованием вместо испытуемого препарата соответствующего объема *имидазольного буферного раствора pH 7,3 R*. Результаты испытания считают достоверными, если время коагуляции в контрольном опыте составляет от 100 до 200 секунд.

2.7.23 ОПРЕДЕЛЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ИНСУЛИНА

Активность испытуемого препарата инсулина определят путем сопоставления его гипогликемического (сахаропонижающего) действия с гипогликемическим действием стандартного образца инсулина.

Стандартный образец и единица действия инсулина.

Стандартный образец инсулина представляет собой препарат высокоочищенного инсулина, активность которого определена путем многократного сопоставления с активностью Международного Стандарта и составляет не менее 25 ЕД в 1 мг. За единицу действия (ЕД) принимают специфическую активность количества массы стандартного образца, эквивалентного по биологическому действию 1 Международной Единице инсулина.

Примечание. Приготовление растворов стандартного образца и испытуемого препарата инсулина. Точную навеску стандартного образца инсулина растворяют в растворе хлористоводородной кислоты (0,003 моль/л) с pH 2,7 – 3,0, содержащем консервант в такой же концентрации, как испытуемый препарат.

Срок годности основного раствора стандартного образца инсулина 4 месяца при температуре 4 ^{0}С.

Перед опытом основной раствор стандартного образца инсулина разводят раствором хлористоводородной кислоты (0,003 моль/л) до концентрации 1 ЕД в 1 мл. Испытуемый препарат инсулина разводят этим же раствором хлористоводородной кислоты до концентрации 1 ЕД в 1 мл, исходя из его предполагаемой активности.

Метод определения биологической активности.

Определение биологической активности инсулина проводят на здоровых кроликах массой 2,5 – 3,5 кг. Животных массой 1,8 – 2,3 кг предварительно не менее 14 суток содержат в условиях вивария, где они получают овес, сено или свежую траву, корнеплоды, комбинированный корм и воду. По истечении этого срока определяют чувствительность кроликов к инсулину. Для этого кроликам дважды с интервалом 7 – 8 суток после 18 часов голодания вводят подкожно раствор стандартного образца инсулина из расчета 0,5 ЕД на 1 кг массы тела животного и определяют величину снижения концентрации сахара в крови в процентах. Кровь для исследования берут из краевой вены уха животных до введения инсулина и через 1,5 и 2,5 часа после его введения (для расчета берут среднюю концентрацию сахара в крови из двух определений после введения инсулина). Кровь берут в условиях, не допускающих чрезмерного волнения кроликов. Из опытов исключают животных с исходной концентрацией сахара в крови ниже и выше пределов, установленных для используемого метода определения содержания сахара в крови (ниже 75 мг % и выше 120 мг % для феррицианидного метода, ниже 52 мг % и выше 94 мг % для глюкозооксидазного метода), а также тех животных, которые реагируют на введение инсулина судорогами или у которых снижение концентрации сахара в крови составляет менее 15 % по отношению к исходной концентрации. Определение биологической активности инсулина проводят не ранее чем через 7 – 8 суток после испытания на чувствительность.

Отобранных для опытов кроликов лишают корма (но не воды) на 18 часов, предшествующих введению инсулина. Животных распределяют на две группы способом случайного выбора (в каждой группе должно быть не менее 9 кроликов). Непосредственно перед введением инсулина кроликов взвешивают и определяют исходную концентрацию сахара в крови. Кроликам одной группы вводят подкожно по 0,5 ЕД стандартного образца инсулина (S) на 1 кг массы тела, кроликам другой группы – такую же дозу испытуемого препарата инсулина (T). Через 1,5 и 2,5 часа после введения инсулина у животных снова определяют концентрацию сахара в крови.

Для каждого кролика рассчитывают снижение концентрации сахара (X) в крови в процентах по формуле:

$$X = \frac{a - b}{a} \times 100,$$

где

a – исходная концентрация сахара в крови в миллиграмм-процентах;

b – средняя концентрация сахара в крови в миллиграмм-процентах из двух определений, проведенных через 1,5 и 2,5 часа после введения инсулина.

Как и при испытании кроликов на чувствительность к инсулину, при расчетах не учитывают животных с исходной концентрацией сахара в крови ниже и выше пределов, установленных для используемого метода, а также реагирующих на указанную дозу инсулина судорогами или дающих снижение концентрации сахара в крови менее 15% по отношению к исходной концентрации.

Через 3 – 5 суток на этих же кроликах проводят повторное испытание с той разницей, что животным из группы, получавшей стандартный образец инсулина (S), вводят испытуемый препарат инсулина (T), а животным группы, получавшей (T), вводят (S).

Рассчитывают среднюю величину снижения концентрации сахара в крови на стандартный образец (% S) и на испытуемый препарат (% T) по данным всего опыта.

Отношение % T / %S выражает относительную активность (R) испытуемого препарата (T). Для выражения активности испытуемого препарата (T) в ЕД его предполагаемую активность (А) умножают на R: T = R • A.

Пример: при определении биологической активности инсулина для инъекций с предполагаемой активностью 40 ЕД в 1 мл получили следующие величины снижения концентрации сахара в крови в процентах (Y).

Первая часть испытания		*Вторая часть испытания*	
Y_S	Y_T	Y_T	Y_S
49	48	50	50
61	50	58	51
35	48,5	53	41
55	65	55	55
39	46	39	45
28	22,5	68	60
53	15	38	43
38	48	44	60
50	63	44	56

$$\sum Y_S = 869;\ \%\ S = 869/18 = 48{,}28.$$

$$R = \%\ T\ /\ \%\ S\ =\ 45{,}83\ /\ 48{,}28 = 0{,}949.$$

$$\sum Y_T = 825;\ \%\ T = 825\ /\ 18\ = 45{,}83.$$

Активность T в ЕД, по данным этого опыта, равна:

$$T = 0{,}949 \bullet 40 = 37{,}96 \text{ ЕД в 1 мл.}$$

Определение проводят не менее 2 раз с каждым испытуемым образцом (T). Среднюю величину при этом получают, объединяя индивидуальные цифры снижения концентрации сахара в крови в процентах в обоих опытах. При расчете окончательного результата должны быть использованы данные, полученные не менее чем на 30 кроликах. Если средняя величина R, по данным двух или большего числа опытов, будет меньше 0,85 или больше 1,15, испытание проводят заново, исходя из новой величины предполагаемой активности испытуемого препарата.

Кролики могут быть использованы повторно для определения биологической активности не ранее чем через 2 недели после окончания предшествующего опыта. Продолжительность использования кроликов в опытах по определению биологической активности инсулина не должна превышать 5 месяцев.

ИСПЫТАНИЕ НА ПРОЛОНГИРОВАННОЕ (УДЛИНЕННОЕ) ДЕЙСТВИЕ ПРЕПАРАТОВ ИНСУЛИНА

Испытание на пролонгированное действие препаратов инсулина основано на сопоставлении длительности гипогликемического эффекта испытуемого препарата и стандартного образца инсулина.

18 здоровых кроликов массой 3 – 4 кг распределяют на две группы по 9 животных способом случайного выбора. Животных содержат в отдельных клетках, за 18 часов до введения инсулина лишают корма (но не воды). В начале опыта у кроликов определяют исходное содержание сахара в крови и рассчитывают среднюю концентрацию сахара в крови для каждой группы. Животным первой группы вводят стандартный образец инсулина, а животным второй группы – испытуемый препарат инсулина. Навеску стандартного образца инсулина растворяют в растворе хлористоводородной кислоты (0,003 моль/л) pH 2,7 – 3,0, содержащем консервант в такой же концентрации, как и препарат. Доза испытуемого препарата и стандартного образца составляет 0,8 ЕД на 1 кг массы тела животного. Испытуемый препарат вводят в неразведенном виде. Концентрация (количество ЕД в 1 мл) стандартного образца должна быть равна концентрации неразведенного испытуемого препарата. Через 1,5; 3,0; 4,5 и 6,0 часов после введения препарата инсулина и стандартного образца определяют концентрацию сахара в крови у кроликов и подсчитывают среднее содержание сахара для каждой группы.

Требования в отношении пролонгированного действия отдельных препаратов инсулина изложены в соответствующих частных статьях.

2.8. МЕТОДЫ АНАЛИЗА ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ И ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ ИЗ НЕГО

Методы анализа лекарственного растительного сырья и лекарственных средств из него проводятся с целью установления подлинности и доброкачественности лекарственного растительного сырья.

Подлинность – это соответствие исследуемого сырья наименованию, под которым оно поступило для анализа. Устанавливается методами: макроскопическим, микроскопическим, качественным фитохимическим, хроматографическим, люминисцентным.

Доброкачественность–соответствие лекарственного растительного сырья требованиям нормативной документации. Определяется следующими видами анализа: товароведческим (определение подлинности, измельченности, содержания примесей, степени зараженности амбарными вредителями), количественным фитохимическим анализом (определение влаги, золы, действующих или экстрактивных веществ), определение микробиологический чистоты, содержания пестицидов, токсических веществ, радионуклидов, биологической стандартизацией (для сырья, содержащего сердечные гликозиды).

2.8.1. ЗОЛА, НЕРАСТВОРИМАЯ В ХЛОРИСТОВОДОРОДНОЙ КИСЛОТЕ

Зола нерастворимая в хлористоводородной кислоте – это остаток, полученный после отделения сульфатной или общей золы хлористоводородной кислотой, рассчитанный на 100 г лекарства.

В тигель, содержащий остаток после отделения общей или сульфатной золы, добавляют 15 мл *воды Р* и 10 мл *кислоты хлористоводородной Р*, раствор покрывают часовым стеклом, аккуратно кипятят в течение 10 мин и охлаждают. Фильтруют через обеззоленный фильтр, промывают фильтр горячей *водой Р* до тех пор, пока фильтрат не станет нейтральным, затем фильтр сушат и сжигают при температуре слабого красного каления (около 500^{o}С), после чего охлаждают в эксикаторе и взвешивают. Процесс сжигания необходимо повторять до тех пор, пока разница между двумя последовательными взвешиваниями будет не более 1 мг.

Допускается проводить определение золы, нерастворимой в соляной кислоте по следующей методике:

Для получения общей золы берут навеску лекарственного растительного сырья массой около 5 г.

В тигель с общей золой приливают 15 мл *кислоты хлористоводородой Р1*; тигель покрывают часовым стеклом и нагревают на кипящей водяной бане в течение 10 мин. Затем тигель снимают и после остывания содержимое фильтруют через беззольный фильр. Тигель, часовое стекло и фильтр промывают дистиллированной водой до прекращения появления мути в промывных водах от капли 2 г/л раствора *нитрата серебра Р*. фильтр помещают в тот же тигель, высушивают, осторожно сжигают в тигле, после чего тигель прокаливают до тех пор, пока разница между двумя последовательными взвешиваниями будет не более 0,5 мг.

Прокаливание ведут в муфельной печи при слабом красном калении (при температуре 550-650 ^{o}С) до полного сгорания, избегая сплавления золы и спекания её с тиглем.

Содержание золы, нерастворимой в хлористоводородной кислоте, рассчитывают в процентах на массу абсолютно сухого лекарственного средства (лекарственного растительного сырья).

$$\frac{(м_1 - м_2)\cdot 100\cdot 100}{м\cdot(100-W)},$$

где:

$м_1$ – масса золы, г;

$м_2$ – масса золы фильтра (если золы последнего более 0,002 г);

м – масса сырья, г;

W – потеря в массе при высушивании сырья, %.

2.8.2. ДОПУСТИМЫЕ ПРИМЕСИ

Допустимые примеси – это примеси, включающие в себя:

1) Посторонние части данного растения, утратившие окраску, предусмотренную частной статьей или части данного растения, не являющиеся лекарственным растительным сырьем.

2) Органические примеси – неядовитые части других растений, солома, сено, вата и т.п.

3) Минеральные примеси – земля, песок, камешки.

4)

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ПРИМЕСЕЙ

Образец лекарственного растительного средства (лекарственного растительного сырья) массой 100-500 г (или минимальное количество, указанное в частной статье) рассыпают тонким слоем. Осматривают невооружённым глазом или с помощью лупы (5 - 10х). Каждую группу посторонних примесей отделяют, взвешивают и рассчитывают их процентное содержание:

$$\frac{м_1 \cdot 100}{м_2},$$

где:

$м_1$ – масса примеси, г;

$м_2$ – масса образца, г.

Процентное содержание посторонних примесей в каждой группе не должно превышать норм, указанных в частной статье. Если в частной статье не указано иное, то количество посторонних примесей в каждой группе не должно превышать 2%.

2.8.3. ТЕХНИКА МАКРОСКОПИЧЕСКОГО И МИКРОСКОПИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

Макроскопический анализ сводится к изучению внешнего вида лекарственного растительного сырья, определению размеров отдельных частей, органолептических показателей (цвета, запаха, вкуса), морфологических диагностических признаков.

Размеры сырья определяются с помощью измерительной линейки: для крупных объектов (более 3 см) – 3-5 измерений, для мелких-10-20 измерений. Мелкие семена и плоды измеряют на миллиметровой бумаге и рассчитывают среднее значение.

Определяют цвет сырья поверхности, в изломе или на разрезе при дневном освещении.

Запах определяют при растирании между пальцами, при изломе или растирании в ступке.

Вкус сырья определяют в последнюю очередь, когда выяснено, что оно не ядовито. Небольшие кусочки сырья жуют и, определив вкус, выплевывают. Для ядовитых объектов вкус не определяют.

Морфологические диагностические признаки определяют для всех видов сырья. Высушенные и смятые части сырья предварительно размягчают во влажной камере или путем погружения на несколько минут в горячую воду, после чего раскладывают на стеклянной пластинке, тщательно расправляя. Рассматривают невооруженным глазом или с помощью лупы (10 х).

Листья (Folia) – лекарственное сырье, представляющее собой высушенные или свежие листья или отдельные листочки сложного листа. Диагностическими признаками являются: тип листьев (простые или сложные), форма и размеры листовой пластинки и черешка, характер края, жилкование, опушенность.

Цветки (Flores) – лекарственное сырье, представляющее собой высушенные отдельные цветки или соцветия, а также их части. Диагностическими признаками являются: тип соцветия, опушенность, форма и размеры цветка, строение околоцветника (число, форму и характер срастания чашелистиков и лепестков), число и строение тычинок и пестиков, характер завязи и цветоложа.

Травы (Herbae) – лекарственное сырье, представляющее собой высушенные или свежие надземные части травянистых растений (стебли с листьями и цветками, отчасти с бутонами и незрелыми плодами). Диагностические признаки для листьев и цветков указаны выше. Для стеблей: тип ветвления, форма поперечного сечения, размеры (длина и диаметр у основания), характер поверхности, опушенность, листорасположение.

Плоды (Fructus) – высушенные или свежие простые или сложные плоды (соплодия) и их части. Диагностическими признаками являются: консистенция околоплодника (перикарпия), характер поверхности, размеры (длина, толщина, поперечник плода), расположение остатков частей цветка и др.

Семена (Semina) - цельные семена или отдельные семядоли. Исследуются сухими. Диагностические признаки: форма, размеры (длина, толщина, поперечник), характер поверхности, цвет, запах, вкус, форма, размеры и расположение зародыша, наличие и форма рубчика или семяшва.

Кора (Cortices) – лекарственное сырье, представляющее собой наружную часть стволов, ветвей и корней деревьев и кустарников, расположенную к периферии от камбия. Диагностические признаки: размеры и форма кусков, особенности наружной и внутренней поверхности и излома.

Корни, корневища, луковицы, клубни, клубнелуковицы (Radices, Rhizomata, Bulbi, Tubera, Bulbotubera) – высушенные или свежие подземные органы многолетних растений, очищенные или отмытые от земли, освобожденные от остатков стеблей и листьев. Диагностические признаки: форма, особенности наружной поверхности и излома, размер, цвет поверхности и на свежем изломе, запах и вкус.

Сборы (Species) – смесь нескольких видов измельченного (реже цельного) лекарственного растительного сырья, иногда с добавлением солей, эфирных масел. Сырье, используемое для приготовления сборов, должно соответствовать требованиям нормативной документации на каждый вид сырья.

Сырье, входящее в состав сборов, измельчают по отдельности, перемешивают до получения равномерной смеси. Если в состав сбора входит соль, из неё готовят насыщенный раствор и опрыскивают им сбор при перемешивании, после чего высушивают при температуре не выше 60 ^{0}С. Сырье гигроскопичное и легко портящееся от увлажнения следует прибавлять в сбор после опрыскивания других компонентов раствором соли и высушивания с последующим перемешиванием. Эфирное масло вносят в сбор в виде спиртового раствора (1:10) опрыскиванием при перемешивании.

Микроскопический анализ зависит от морфологической группы исследуемого объекта, а также от состояния сырья – цельного, измельчённого (дробленого, резаного) или порошкообразного.

Цельное сырье может быть обмолоченным. Его размер указываются в частных статьях.

Измельченность лекарственного растительного сырья определяется соответствующим размером отверстия сита, через которое полностью проходит измельченное лекарственное растительное сырьё.

По измельченности различают:

Резаное и дробленое
Крупный порошок
Среднекрупный порошок
Среднемелкий порошок
Мелкий порошок

Мельчайший порошок

Для определения измельченности порошков проводят ситовой анализ с помощью сит с размерами отверстий, указанными в таблице 2.8.3.-1.

Таблица 2.8.3-1

Наименование	**Номинальный размер отверстия, мкм**
Резаное и дробленое	8000
Крупный порошок	2000
Среднекрупный порошок	1000
Среднемелкий порошок	500
Мелкий порошок	250
Мельчайший порошок	180

Лекарственное растительное сырьё в количестве 25 – 100 г помещают на соответствующее сито, снабженное плотно пригнанным приемным лотком и крышкой, и просеивают, не допуская дополнительного измельчения. Просеивание измельчённых частиц считается законченным, если количество сырья, прошедшего сквозь сито при дополнительном просеве в течение 1 мин, составляет менее 1 %, оставшегося на сите.

Лекарственное растительное сырьё должно полностью проходить сквозь сито с указанным размером отверстий.

В случае необходимости в частных статьях указывают сито с размером отверстий соответствующим измельченности лекарственного растительного сырья.

Микроскопический анализ может проводиться одновременно с микрохимическим анализом.

ЛИСТЬЯ, ТРАВЫ, ЦВЕТКИ

Цельное и резаное сырье. При исследовании цельного сырья берут кусочки пластинки листа с краем и жилкой; у трав берут лист, иногда также кусочек стебля и цветок, у цветков – чашечку и венчик. При исследовании резаного сырья берут по нескольку различных кусочков.

Просветление можно проводить двумя способами.

I. Несколько кусочков сырья помещают в колбу или пробирку, прибавляют раствор 25 г/л *натрия гидроксида Р* и кипятят в течение 1 – 2 мин. Затем содержимое выливают в чашку Петри (или фарфоровую), жидкость сливают и сырье тщательно промывают *водой Р*. Из воды кусочки сырья вынимают скальпелем или лопаточкой и помещают на предметное стекло в каплю *раствора хлоралгидрата Р1* или *глицерина Р*.

II. Кусочки кипятят в *растворе хлоралгидрата Р1*, разведенного *водой Р* (1:1), в течение 5 – 10 мин (до просветления). Просветленный кусочек сырья помещают на предметное стекло в каплю *раствора хлоралгидрата Р1* или *глицерина Р*, разделяют скальпелем или препаровальной иглой на две части, одну из них осторожно переворачивают. Объект накрывают покровным стеклом, слегка подогревают до удаления пузырьков воздуха и после охлаждения рассматривают лист с обеих сторон под микроскопом сначала при малом, затем при большом увеличении. При приготовлении микропрепаратов из толстых листьев их предварительно раздавливают скальпелем.

Для исследования стеблей их отрезки кипятят в растворе 50 г/л *натрия гидроксида Р*, тщательно промывают *водой Р*, снимают эпидермис скальпелем или препаровальными иглами и рассматривают его с поверхности; из остальных тканей готовят препарат, раздавливая объект скальпелем на предметном стекле в *растворе хлоралгидрата Р1* или *глицерина Р*.

При необходимости приготовления поперечных срезов листьев и стеблей их кипятят в *растворе хлоралгидрата Р1* в течение 10 мин и делают срезы, зажимая кусочки листа в пробку или сердцевину бузины. Готовые срезы помещают в *воду Р* и далее используют для приготовления микропрепаратов, рассматривая их в *растворе хлоралгидрата Р1*.

Порошок. На предметное стекло наносят 1 – 2 капли *раствора хлоралгидрата Р1* и небольшое количество исследуемого порошка. Порошок берут кончиком препаровальной иглы, смоченной *раствором хлоралгидрата Р1*, тщательно размешивают, закрывают покровным стеклом и нагревают до удаления пузырьков воздуха. Затем стекло слегка придавливают ручкой препаровальной иглы, выступившую по краям жидкость удаляют полоской фильтровальной бумаги. Порошки кожистых листьев просветляют кипячением в растворе 50 г/л *натрия гидроксида Р*.

Диагностическими признаками являются: форма и размеры клеток эпидермы, тип устьиц, наличие и строение трихом, вместилищ, эфиро-масличных железок, кристаллических включений, механической и проводящей тканей, млечников, секреторных каналов.

ПЛОДЫ, СЕМЕНА

Цельное сырье. Готовят препараты кожуры семени и околоплодника с поверхности или поперечные срезы.

Препараты поверхности кожуры и околоплодника. 2 – 3 семени или плода кипятят в пробирке в растворе 50 г/л *натрия гидроксида Р* в течение 2 – 3 мин и тщательно промывают *водой Р*. Объект помещают на предметное стекло, препаровальными иглами отделяют кожуру семени или ткани околоплодника и рассматривают их в *растворе хлоралгидрата Р1* или *глицерина Р*.

Срезы. Для приготовления срезов сухие плоды и семена предварительно размягчают, поместив их на сутки во влажную камеру (влажной камерой служит эксикатор с водой, в которую добавлено несколько капель хлороформа) или водяным паром в течение 15 – 30 мин или более в зависимости от твердости объекта.

Мелкие плоды и семена запаивают в парафиновый блок размером 0,5х0,5х1,5 см. Кончиком нагретой препаровальной иглы расплавляют парафин и в образовавшуюся ямку быстро погружают объект. Поверхность объекта должна быть сухой. Срезы объекта делают вместе с парафином; срезы выбирают из парафина препаровальной иглой, смоченной жидкостью, и готовят микропрепараты в *растворе глицерина Р* или *хлоралгидрата Р1*.

Диагностические признаки: форма и строение клеток экзокарпия (эпидермиса) , наличие и строении трихом, расположение и форма механических элементов в мезокарпии, число и расположение эфиро-масличных каналов, проводящих пучков, наличие кристаллических включений.

Порошок. Готовят несколько микропрепаратов для выявления диагностических элементов кожуры семени и околоплодника и содержимого эндосперма или зародыша. Препарат готовят так же, как указано в разделе «Листья, травы, цветки». В качестве просветляющей жидкости используют *раствор хлоралгидрата Р1* или раствор 500 г/л *натрия гидроксида Р*.

Крахмал. Готовят два препарата – в *растворе Люголя Р* и в *воде Р*; от йода крахмальные зерна окрашиваются в синий цвет. В воде определяют их форму, строение, размеры крахмальных зерен измеряют окулярным микрометром.

Жирное и эфирное масло. Для обнаружения жирного и эфирного масла готовят препарат в *растворе судана III Р* и подогревают; капли жирного или эфирного масла окрашиваются в оранжево-розовый цвет.

Слизь. Для обнаружения слизи готовят препарат порошка в *растворе черной туши Р* и тотчас рассматривают под микроскопом (малое увеличение); слизь заметна в виде бесцветных масс на черном фоне.

При исследовании строения клеток кожуры и околоплодника в порошке из плодов и семян, содержащих крахмал или незначительное количество жирного масла, препарат готовят в *растворе хлоралгидрата Р1* при легком подогревании. При необходимости порошок обезжиривают и просветляют.

Для обезжиривания порошок сырья помещают в пробирку с притертой пробкой и заливают 2 – 3 раза смесью *спирта Р* с *эфиром Р* (1:3) и после настаивания каждый раз в течение 20 мин растворитель сливают. Вместо смеси спирта с эфиром для обезжиривания можно использовать *ксилол Р* или *эфир Р*.

Для просветления 0,5 – 1 г порошка насыпают в фарфоровую чашку, прибавляют 5 – 10 мл *кислоты азотной разведенной P2* и кипятят в течение 1 мин, затем жидкость процеживают через ткань и порошок промывают горячей *водой Р*. Остаток на ткани собирают лопаточкой обратно в фарфоровую чашку, обливают 5 – 10 мл раствора 50 г/л *натрия гидроксида Р*, кипятят в течение 1 мин, снова процеживают через ту же ткань и промывают горячей *водой Р*. После этого порошок рассматривают в *растворе глицерина Р* под микроскопом.

КОРА

Цельное сырье. Готовят поперечные или продольные срезы коры. Кусочки коры размером 2–3х0,5–1 см кипятят в колбе или пробирке с *водой Р* в течение 5 мин. Размягченные куски выравнивают скальпелем так, чтобы они имели строго поперечное или продольное сечение. Делают срезы и готовят микропрепараты в *растворе хлоралгидрата P1* или *глицерина Р*. При необходимости готовят препараты в соответствующих реактивах для выявления различных структур или веществ.

Диагностические признаки: толщина, окраска и характер пробки, наличие колленхимы, толщина первичной и вторичной коры, ширина сердцевинных лучей, особенности расположения и количество лубяных волокон, каменистых клеток, клеток с эфирным маслом, включения кристаллов оксалата кальция, млечники.

Одревесневшие (лигнифицированные) элементы. К срезу на предметном стекле прибавляют несколько капель раствора 10 г/л *флороглюцина Р* в *спирте Р* и 1 каплю раствора 250 г/л *серной кислоты Р*. Через минуту жидкость отсасывают полоской фильтровальной бумаги, срез заключают в *раствор хлоралгидрата P1* или *глицерина Р* и закрывают покровным стеклом (рассматривают без подогревания); одревесневшие механические элементы окрашиваются в малиново-красный цвет.

Для окраски одревесневших элементов можно использовать также раствор 10 г/л *сафранина Р*. Срезы помещают в раствор 10 г/л *сафранина Р* в *спирте (50 % об/об) Р* на 30 мин (в закрытом бюксе или на часовом стекле), промывают сначала *спиртом (50 % об/об) Р*, затем подкисленным спиртом (на 100 мл *спирта Р* прибавляют 2 капли *хлористоводородной кислоты Р*) и заключают на предметном стекле в *глицерин Р*. Одревесневшие оболочки окрашиваются в красный цвет.

Крахмал. Для обнаружения крахмала делают соскоб с сухой коры и рассматривают его в *растворе Люголя Р*. Крахмальные зерна окрашиваются в синий цвет.

Дубильные вещества. Наличие дубильных веществ устанавливают, нанося 1 каплю раствора 10 г/л *железа (III) аммония сульфата Р* или раствора 30 г/л *железа (III) хлорида Р* на внутреннюю поверхность сухой коры; появляется черно-синее или черно-зеленое окрашивание.

Производные антрацена. Наличие производных антрацена определяют, нанося 1 – 2 капли раствора 50 г/л *натрия гидроксида Р* на внутреннюю поверхность коры (кроваво-красное окрашивание), или проводят микросублимацию описанным ниже способом.

Резаное сырье. Соскоб коры или мелкие кусочки кипятят в течение 3 – 5 мин в растворе 50 г/л *натрия гидроксида Р*, промывают *водой Р* и готовят микропрепараты, раздавливая объект скальпелем в *растворе глицерина Р* или *хлоралгидрата P1*.

Одревесневшие элементы определяют по реакции, описанной для цельного сырья.

Наличие крахмала, дубильных веществ, производных антрацена определяют в соскобе сухой коры.

Порошок. Готовят несколько микропрепаратов для выявления диагностических элементов коры (в *растворе хлоралгидрата P1*) и содержащихся в ней веществ.

Одревесневшие (лигнифицированные) элементы. На предметное стекло помещают около 0,1 г порошка, прибавляют 1 – 2 капли раствора 10 г/л *флороглюцина Р* в *спирте Р*, 1 каплю раствора 250 г/л *серной кислоты Р* и закрывают покровным стеклом. Затем с одной стороны наносят 1 – 2 капли *раствора*

хлоралгидрата Р1, а с противоположной – отсасывают жидкость фильтровальной бумагой. Одревесневшие механические элементы окрашиваются в малиново-красный цвет.

Производные антрацена (реакция микросублимации). На предметное стекло ставят трубку диаметром 1,5 см и высотой 2 см. Внутрь стеклянной трубки помещают небольшое количество испытуемого порошка (или соскоба), сверху накрывают другим предметным стеклом, ставят на асбестовую сетку, закрепленную в штативе, и подогревают. Пламя горелки следует держать от предметного стекла на расстоянии 5 – 7 см. На поверхность стекла, которое служит для улавливания сублимата, помещают кусочки фильтровальной бумаги и смачивают время от времени холодной водой. Через некоторое время на нижней стороне стекла появляется налет. Под микроскопом в сублимате видны тонкие желтые иголочки, которые в ультрафиолетовом свете (люминесцентный микроскоп) имеют яркое желтое или оранжево-красное свечение. В спиртовом растворе 50 г/л *калия гидроксида Р* сублимат растворяется с красным окрашиванием.

КОРНИ, КОРНЕВИЩА, КЛУБНИ, ЛУКОВИЦЫ, КЛУБНЕЛУКОВИЦЫ

Цельное сырье. Готовят поперечные и продольные срезы. Небольшие куски подземных органов помещают в холодную *воду Р* и выдерживают около суток, затем помещают в смесь *спирта Р* и *глицерина Р* (1:1) на 3 сут. Размоченные объекты выравнивают скальпелем так, чтобы они имели строго поперечное или продольное сечение. Делают срезы и готовят микропрепараты в растворе *хлоралгидрата Р1* или *глицерина Р* и рассматривают диагностические признаки сначала при малом, затем при большом увеличении.

Диагностические признаки: особенности строения эпидермы или перидермы, расположение и строение механических, проводящих, секреторных тканей, кристаллы оксалата кальция, запасные вещества.

С соскобом сухих подземных органов или порошком проводят необходимые микрохимические реакции.

Наличие одревесневших элементов, крахмала, слизи, жирного и эфирного масла, дубильных веществ, производных антрацена определяют, как указано в разделах «Плоды и семена» и «Кора».

Инулин. Для обнаружения инулина на предметное стекло помещают около 0,1 г порошка, 1 – 2 капли *раствора α-нафтола Р1* (*резорцина Р* или *тимола Р*) и 1 каплю *кислоты серной Р*; появляется красновато-фиолетовое окрашивание (от резорцина – оранжево-красное). О наличии инулина можно делать выводы только при отсутствии крахмала.

Резаное или дробленое сырье. Кусочки подземных органов кипятят в течение 3 – 5 мин в растворе 50 г/л *натрия гидроксида Р*, тщательно промывают *водой Р* и готовят микропрепараты, раздавливая кусочки в *растворе глицерина Р* или *хлоралгидрата Р1*.

С соскобом или порошком подземных органов проводят микрохимические реакции, как указано в разделе «Кора».

Порошок. Готовят несколько препаратов для выявления диагностических элементов подземных органов (в *растворе хлоралгидрата Р1*) и содержащихся в них веществ.

Наличие одревесневших элементов, крахмала, слизи, жирного и эфирного масла, дубильных веществ и производных антрацена определяют, как указано в разделах «Плоды и семена» и «Кора».

ЛЮМИНЕСЦЕНТНАЯ МИКРОСКОПИЯ

Метод люминесцентной микроскопии применяется (где это целесообразно) для определения подлинности лекарственного растительного сырья. Преимуществом метода является возможность его применения для изучения сухого растительного материала, из которого готовят толстые срезы или препараты порошка, и

рассматривают их в падающем свете, при освещении препарата сверху, через опак-иллюминатор или объектив.

Люминисцентная микроскопия выполняется с помощью люминесцентных микроскопов, снабжённых специальными люминисцентными осветителями.

Приготовление микропрепаратов. Для приготовления микропрепаратов используют сухое лекарственное растительное сырьё или его порошок. Предварительное размачивание сырья исключается, так как это приводит к вымыванию веществ из клеток; допускается лишь непродолжительное размягчение во влажной камере.

Л и с т ь я . Готовят обычно препараты из порошка листьев, которые рассматривают без включающей жидкости. Наиболее яркая люминисценция характерна для одревесневших элементов – сосудов жилки, механических волокон, а также кутикулы и кутинизированных оболочек различных эпидермальных образований (волосков, желёзок и др.). В эпидермальных клетках часто содержатся флавоноиды, обусловливающие коричневую, жёлтую или зеленовато-жёлтую люминесценцию. Клетки мезофилла содержат различные включения – жёлтые, голубые, зеленовато-жёлтые, коричневые – в зависимости от их химического состава. Хлорофилл в высушенном растительном материале не люминисцирует. Кристаллы оксалата кальция также не обладают люминисценцией. При необходимости приготовления среза лист предварительно размягчают во влажной камере и с помощью бритвы делают толстый срез (2 – 3 мм), который закрепляют на предметном стекле пластилином. Более тонкие срезы помещают во включающую жидкость и накрывают покровным стеклом.

В качестве включающей жидкости используют *воду Р*, *глицерин Р*, раствор 50 г/л *поливинилового спирта Р*, нефлюоресцирующее *вазелиновое масло Р*. Включающая жидкость не должна растворять содержащиеся в препарате люминесцирующие вещества.

Т р а в ы . При анализе трав готовят микропрепараты листьев. При необходимости приготовления препарата стебля его размягчают во влажной камере и готовят срезы. Толстые срезы (2 – 3 мм) закрепляют на предметном стекле с помощью пластилина и рассматривают без включающей жидкости, тонкие – помещают в подходящую жидкость и накрывают покровным стеклом. Наиболее яркую люминесценцию имеют одревесневшие элементы проводящих пучков – сосуды и механические волокна, склеренхимные клетки, встречающиеся в коре и сердцевине стебля. В клетках эпидермиса и коры часто встречаются флавоноиды; у некоторых видов сырья в клетках обкладки, вокруг проводящих пучков содержатся алкалоиды, которые обладают разнообразным свечением: синим, голубым, зеленым, зеленовато-жёлтым, золотисто-жёлтым, оранжево-красным в зависимости от состава.

Ц в е т к и . Чаще готовят препараты из порошка цветков или отдельных частей цветка (соцветия), которые рассматривают обычно без включающей жидкости. В цветках часто содержатся флавоноиды, каротиноиды и другие вещества, обладающие флюоресценцией. Отчетливо видны пыльцевые зерна, имеющие жёлтое, зеленовато-жёлтое или голубоватое свечение.

П л о д ы . Готовят обычно поперечные срезы плода после предварительного размягчения во влажной камере и рассматривают во включающей жидкости или без нее в зависимости от толщины среза. Для плодов характерна люминесценция тканей околоплодника (экзокарпия, механических клеток мезокарпия, проводящих пучков). Отчетливо видны секреторные каналы – ярко светится их содержимое; клетки выстилающего слоя обычно имеют желтовато-коричневую люминесценцию. В содержимом каналов нередко видны ярко люминесцирующие кристаллические включения, чаще всего жёлтого или жёлто-зеленого цвета.

С е м е н а . Готовят обычно поперечные срезы семени после предварительного размягчения во влажной камере и рассматривают их во включающей жидкости или без нее в зависимости от толщины среза. Обращают внимание на характер люминесценции семенной кожуры, в которой отчетливо выделяются склеренхимные слои. Клетки эпидермиса, содержащие слизь, обычно имеют сине-голубое свечение. Эндосперм и ткани зародыша, богатые жирным маслом, характеризуются голубой люминесценцией.

К о р а . Кору предварительно размягчают во влажной камере, готовят толстые

поперечные срезы (до 3 – 5 мм), которые закрепляют на предметном стекле пластилином, и рассматривают без включающей жидкости; тонкие срезы заключают в жидкость. Для некоторых видов сырья характерна люминесценция пробкового слоя коры: оболочки клеток пробки светятся интенсивно-синим, их содержимое – темно-красным (антоцианы). Яркое и разнообразное свечение имеют механические элементы (лубяные волокна и каменистые клетки): голубое, зеленовато-голубое, желтовато-зеленое. Люминесценция паренхимы коры зависит от химического состава. Антраценпроизводные обусловливают яркое оранжевое или огненно-оранжевое свечение. Дубильные вещества обладают свойством «тушить» люминесценцию, поэтому ткани, содержащие дубильные вещества, темно-коричневого, почти черного, цвета.

Препарат, приготовленный из порошка коры или соскоба, рассматривают без включающей жидкости. В нем наиболее ярко видны механические элементы.

Корни, корневища, луковицы, клубни, клубнелуковицы. Готовят поперечные срезы, распилы, препараты порошка или соскоба. Срезы готовят из материала, предварительно размягчённого во влажной камере, распилы (из толстых корней и корневищ) – из сухого материала с помощью тонкой пилы или фрезы. С помощью бритвы с поверхности распила снимают тонкий слой для удаления слоя клеток, покрытых пылью. Толстые срезы и распилы (до 3 – 5 мм) закрепляют на предметном стекле пластилином и рассматривают без включающей жидкости. Слой пробки у подземных органов обычно тусклый, почти чёрный. Ярко люминесцируют древесины (у корней и корневищ) и проводящие пучки, а также склеренхимные элементы. Их свечение очень разнообразно: от буровато-зелёного, жёлто-зелёного до светло-голубого и интенсивно-синего в зависимости от вида сырья. Ещё более разнообразна люминесценция паренхимных тканей и различных секреторных образований (вместилищ, каналов, ходов, млечников, различных идиобластов), что определяется их химическим составом. В секреторных образованиях встречаются кристаллические включения кумаринов, алкалоидов, флавоноидов, обладающие яркой люминесценцией.

В препаратах порошка видны отдельные сосуды, группы механических волокон, каменистые клетки, отдельные секреторные образования и их обрывки, ярко люминесцирующие клетки паренхимы, содержащие те или иные вещества.

Препараты в люминесцентном микроскопе рассматривают в ультрафиолетовом свете, наблюдая первичную (собственную) люминесценцию.

2.8.4. КОЭФФИЦИЕНТ НАБУХАНИЯ

Коэффициент набухания – это объём в миллилитрах, занимаемый 1 г лекарственного растительного средства (лекарственного растительного сырья), включая прилипшую слизь, после набухания в водном растворе в течение 4 ч.

В градуированный цилиндр с притёртой пробкой вместимостью 25 мл и высотой 125±5 мм с делениями по 0,5 мл помещают 1,0 г образца лекарственного растительного средства (лекарственного растительного сырья), цельного или измельчённого как указано в частной статье. Смачивают образец 1 мл *спирта Р*, если иного не указано в частной статье, добавляют 25 мл *воды Р* и закрывают цилиндр. Встряхивают интенсивно каждые 10 мин в течение часа. Затем оставляют стоять 3 ч. Через 1,5 ч после начала испытания сливают максимально возможное количество жидкости и любые частички сырья, плавающие на поверхности жидкости путём вращения цилиндра вокруг вертикальной оси. Через 3 ч измеряют объём, занимаемый образцом вместе с прилипшей слизью. Параллельно проводят 3 испытания.

Коэффициент набухания равняется среднему значению, вычисленному по результатам трёх параллельных испытаний.

Допускается использование другой градуированной посуды для проведения испытания, что указывается в частной статье.

2.8.5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВОДЫ В ЭФИРНЫХ МАСЛАХ

Смешивают 10 капель эфирного масла с 1 мл *углерода дисульфида Р*. При стоянии раствор должен оставаться прозрачным.

2.8.6. ПОСТОРОННИЕ ЭФИРЫ В ЭФИРНЫХ МАСЛАХ

Нагревают 1 мл эфирного масла в течение 2 мин на водяной бане с 3 мл свежеприготовленного раствора 100 г/л *калия гидроксида Р* в *спирте Р*. В течение 30 мин не должны образовываться кристаллы, даже при охлаждении.

2.8.7. ЖИРНЫЕ И МИНЕРАЛЬНЫЕ МАСЛА В ЭФИРНЫХ МАСЛАХ

Капают 1 каплю эфирного масла на фильтровальную бумагу. Капля должна полностью испариться в течение 24 ч не оставляя каких-либо просвечивающихся или жирных пятен.

Допускается небольшое подогревание, ускоряющее процесс испарения эфирного масла.

2.8.8. ЗАПАХ И ВКУС ЭФИРНЫХ МАСЕЛ

Перемешивают 3 капли эфирного масла, 5 мл *спирта (90 % об/об) Р* и 10 г порошкообразной *сахарозы Р*. Запах и вкус должны быть идентичными запаху и вкусу растения или частей растения, из которых получено эфирное масло.

Запах и вкус должны быть идентичными запаху и вкусу стандартного образца эфирного масла, полученного из этого растения.

2.8.9. ОСТАТОК ПОСЛЕ ВЫПАРИВАНИЯ ЭФИРНОГО МАСЛА

Остаток эфирного масла после выпаривания – это процентное по массе количество остатка, образующегося при выпаривании эфирного масла на водяной бане в условиях, описанных ниже.

Прибор. Прибор (рис. 2.8.9.-1) состоит из следующих частей:

- водяная баня с крышкой с отверстием в ней диаметром 70 мм;
- чашка для выпаривания из инертного к содержимому материала;
- эксикатор.

Метод. Взвешивают в предварительно нагретую на водяной бане в течение 1 ч и охлаждённую в эксикаторе чашку для выпаривания 5,00 г эфирного масла, если иного не указано в частной статье. Нагревают масло на интенсивно кипящей бане в вытяжном шкафу в течение указанного времени. Охлаждают в эксикаторе и взвешивают.

Во время испытания уровень воды в бане должен поддерживаться на расстоянии около 50 мм ниже уровня крышки.

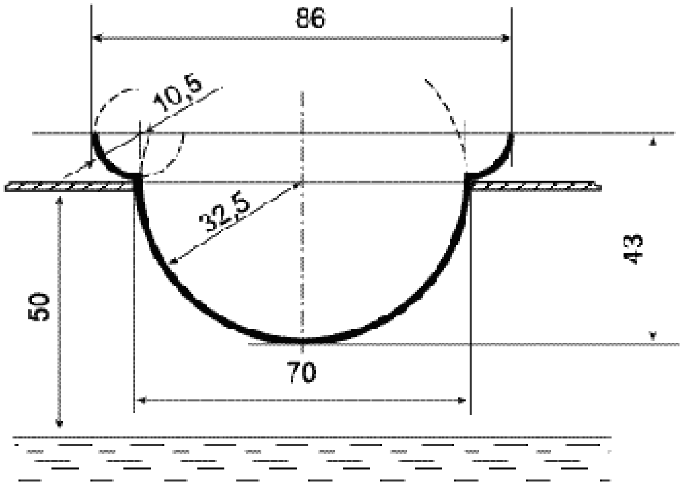


Рис 2.8.9.-1. Прибор для определения остатка после выпаривания эфирного масла. *Расстояния даны в миллиметрах.*

2.8.10. РАСТВОРИМОСТЬ ЭФИРНЫХ МАСЕЛ В СПИРТЕ

Помещают 1,0 мл эфирного масла в цилиндр вместимостью 25-30 мл с притёртой пробкой. Необходимо поддерживать постоянные температурные условия, рекомендуемая температура (20±0,2) °С. Добавляют спирт указанной в частной статье концентрации, используя бюретку вместимостью 20 мл, добавляя его сначала по 0,1 мл до образования раствора, а затем добавляя по 0,5 мл до истечения всех 20 мл, часто и интенсивно встряхивая цилиндр. Фиксируют объём использованного спирта в момент, когда образуется прозрачный раствор или, если раствор становится мутным или опалесцирующим до того, как добавлено 20 мл спирта, фиксируют объём, при котором появляется мутность или опалесценция и, где это применимо, объём, когда мутность или опалесценция исчезает.

Если при добавлении 20 мл спирта крепости, указанной в частной статье, прозрачный раствор не образовался, повторяют испытание, используя более высокую концентрацию спирта.

Считают, что эфирное масло «растворимо в n или более объёмах спирта данной концентрации t» когда прозрачный раствор в n объёмах остаётся прозрачным при сравнении с неразбавленным маслом после дальнейшего добавления спирта той же концентрации до 20 объёмов спирта.

Считают, что эфирное масло «растворимо в n объёмах спирта данной концентрации t с появлением помутнения при разбавлении» когда прозрачный раствор в n объёмах становится мутным в n_1 объёмах (n_1 меньше 20) и остаётся таким после дальнейшего постепенного добавления спирта той же концентрации до 20 объёмов.

Считают, что эфирное масло «растворимо в n объёмах спирта данной концентрации t с появлением помутнения в промежутке между объёмами n_1 и n_2», когда прозрачный в n объёмах спирта раствор становится мутным в n_1 объёмах (n_1 меньше 20) и остаётся таким при последующем добавлении спирта той же концентрации до n_2 объёмов спирта, а затем становится прозрачным (n_2 меньше 20).

Считают, что эфирное масло «растворимо с появлением опалесценции», когда спиртовой раствор проявляет голубоватое окрашивание, подобное окрашиванию стандарта опалесценции, приготовленного по следующей методике: смешивают 0,5 мл раствора *серебра нитрата Р2* и 0,05 мл *кислоты азотной Р*, добавляют 50 мл раствора *натрия хлорида* 12 мг/л, перемешивают и оставляют на 5 мин в защищённом от света месте.

2.8.11. ОПРЕДЕЛЕНИЕ 1,8-ЦИНЕОЛА В ЭФИРНЫХ МАСЛАХ

Взвешивают 3,00 г масла, предварительно высушенного с помощью *натрия сульфата безводного Р*, в сухой пробирке и добавляют 2,10 г расплавленного *крезола Р*. Помещают пробирку в аппарат для определения точки замерзания (*2.2.18*) и постоянно взбалтывая, охлаждают. При кристаллизации наблюдается небольшое повышение температуры. Фиксируют точку наивысшей достигнутой температуры (t_1).

Расплавляют смесь на водяной бане при температуре, которая не превышает температуру t_1 более чем на 5ºС и помещают пробирку в аппарат, в котором поддерживается температура на 5ºС ниже, чем t_1. После того, как прошла кристаллизация или после того, как температура смеси упала на 3ºС ниже температуры t_1 содержимое пробирки начинают помешивать. Отмечают наивысшую температуру при кристаллизации смеси (t_2). Повторяют операцию до тех пор, пока значения двух максимумов температур t_2 не будут отличаться не более чем на 0,2ºС. Если происходит переохлаждение, инициируют кристаллизацию добавлением маленького кристалла комплекса, состоящего из 3,00 г *цинеола Р* и 2,10 г расплавленного *крезола Р*. Если температура t_2 ниже 27,4ºС, повторяют испытание после добавления 5,10 г комплекса.

Содержание цинеола коррелирует со значениями температуры t_2 и эта зависимость представлена в таблице 2.8.11.-1. Если было добавлено 5,10 г, рассчитывают процентное *м/м* содержание цинеола по формуле:

$$2(A-50),$$

где:

А – значение, найденное в таблице 2.8.11.-1.

Таблица 2.8.11.-1

t_2 °С	цинеол, % *м/м*	t_2 °С	цинеол, % *м/м*	t_2 °С	цинеол, % *м/м*	t_2 °С	цинеол, % *м/м*
24	45,5	32	56,0	40	67,0	48	82,0
25	47,0	33	57,0	41	68,5	49	84,0
26	48,5	34	58,5	42	70,0	50	86,0
27	49,5	35	60,0	43	72,5	51	88,5
28	50,5	36	61,0	44	74,0	52	91,0
29	52,0	37	62,5	45	76,0	53	93,5
30	53,5	38	63,5	46	78,0	54	96,0
31	54,5	39	65,0	47	80,0	55	99,0

Содержание цинеола, соответствующее высшей наблюдаемой температуре (t_2), может быть получено, если необходимо, путём интерполяции.

2.8.12. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭФИРНОГО МАСЛА

Определение эфирного масла в лекарственных растительных средствах (лекарственном растительном сырье) осуществляется путём его перегонки с паром в специальном приборе в условиях, описанных ниже. Дистиллят собирают в градуированную трубку, используя ксилол для поглощения эфирного масла; водная фаза автоматически возвращается в дистилляционную колбу.

Прибор. Прибор состоит из следующих частей:

а) круглодонная колба подходящего объёма с коротким притёртым горлышком, имеющим внутренний диаметр в широком конце 29 мм;

б) конденсирующая система (см. рисунок 2.8.12.-1), которая точно подогнана к колбе и различные части которой сплавлены в одно целое; используемое стекло должно иметь малый коэффициент расширения, при этом:

- пробка *K´* имеет отверстие, а трубка *K* имеет желоб диаметром 1 мм, который совпадает с отверстием в пробке; широкий конец трубки *K* притёрт и имеет внутренний диаметр 10 мм;
- грушеобразное расширение *J* вместимостью 3 мл;
- трубка *JL* с делениями 0,01 мл;
- вместимость шарообразного расширения *L*, около 2 мл;
- трёхходовой кран *M*;
- переход (спай) *B*, находящийся на 20 мм выше самой высокой риски градуировки;

в) подходящий нагревательный прибор с точной регулировкой температуры;

г) штатив с кольцом, покрытым изолирующим материалом.

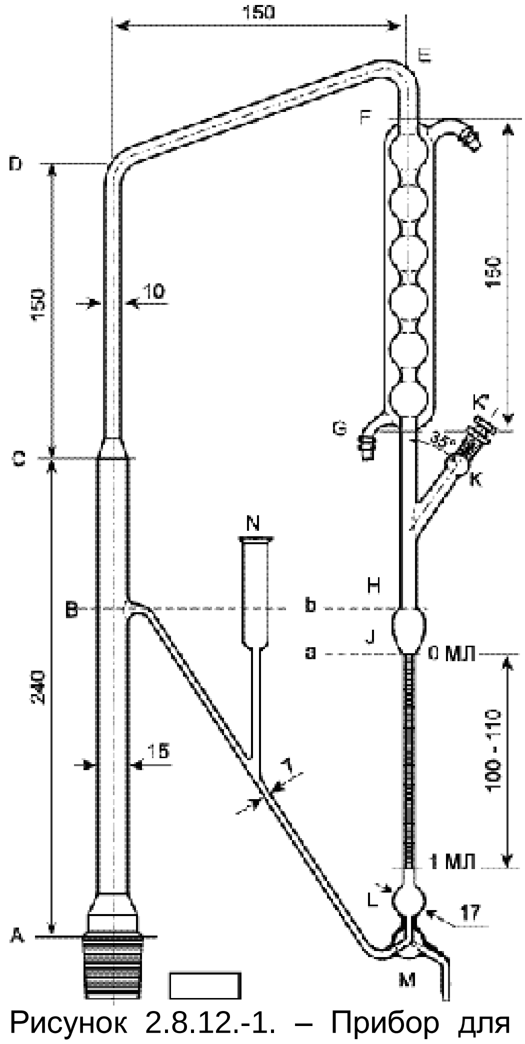


Рисунок 2.8.12.-1. – Прибор для определения эфирного масла в лекарственных растительных препаратах.

Размеры даны в миллиметрах.

Конденсирующая система может отличаться по строению от приведённой на рисунке 2.8.12.-1.

Метод А. Используют тщательно вымытый прибор. Испытание проводят в соответствии с особенностями испытуемого лекарственного растительного средства (лекарственного растительного сырья). В колбу наливают указанный объём жидкости для перегонки, добавляют несколько кусочков пористого фарфора и присоединяют к конденсирующей системе. Наливают *воду Р* в трубку через воронку *N* до тех пор, пока она не достигнет уровня спая *B*. Извлекают пробку *K´* и наливают обозначенное количество *ксилола Р*, используя пипетку таким образом, чтобы её кончик находился в

нижнем конце трубки *K*. Возвращают на место пробку *K´* и убеждаются, что желоб в трубке совпадает с отверстием в пробке. Нагревают жидкость и регулируют скорость перегонки, чтобы она соответствовала 2-3 мл/мин, если иного не указано в частной статье.

Для определения скорости перегонки необходимо во время перегонки понизить уровень воды с помощью трёхходового крана так, чтобы мениск остановился на уровне нижней отметки (a) (см рис. 2.8.12.-2). Затем закрывают кран и засекают время, за которое уровень жидкости достигнет верхней отметки (b). Открывают кран и продолжают перегонку, регулируя подогрев так, чтобы достичь оптимальной скорости перегонки. Перегонку проводят в течение 30 мин. После этого прекращают нагрев и по прошествии минимум 10 мин измеряют объём ксилола в градуированной трубке.

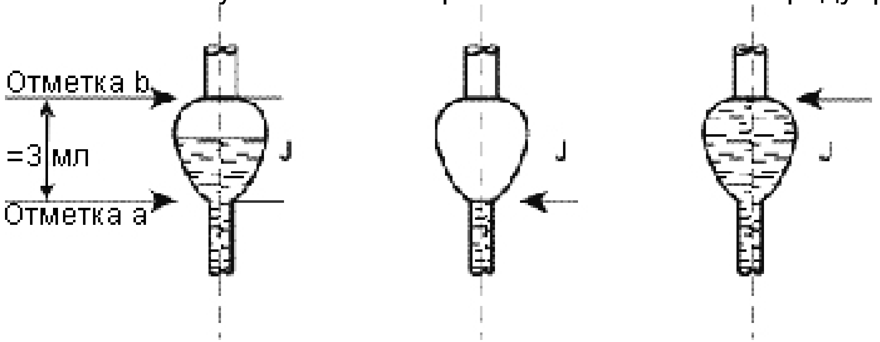


Рисунок 2.8.12.-2

Помещают в колбу указанное в частной статье количество образца и продолжают процесс перегонки как описано выше в течение предписанного времени и с обозначенной скоростью. По истечении необходимого времени перегонки прекращают нагревание и через 10 мин измеряют объём жидкости, собранной в градуированной трубке и вычитают из полученного значения ранее найденный объём ксилола. Полученная разница соответствует количеству эфирного масла в массе взятого образца. Подсчитывают результат в миллилитрах на 1000 г лекарственного растительного средства (лекарственного растительного сырья).

Содержание эфирного масла рассчитывают на массу абсолютно сухого лекарственного средства (лекарственного растительного сырья).

Если эфирное масло собираются использовать далее в аналитических исследованиях, то безводная смесь ксилола и эфирного масла может быть получена следующим образом: достают пробку *K´* и добавляют 0,1 мл раствора *натрия флуоресцеината Р* концентрацией 1 г/л и 0,5 мл *воды Р*. Сливают смесь ксилола и эфирного масла таким образом, чтобы она оказалась в шарообразном расширении *L* с использованием трёхходового крана, оставляют на 5 минут и спускают аккуратно смесь до уровня крана *M*. Открывают кран против хода часовой стрелки и дают вытечь воде из соединяющей трубки *BM*. Промывают трубку *ацетоном Р* и небольшим количеством *толуола Р*, добавляя их через воронку *N*. Поворачивая кран против часовой стрелки, сливают смесь ксилола и эфирного масла в подходящую колбу.

Наряду с данным методом, могут быть использованы следующие методы определения эфирного масла.

Метод В. Используют прибор, изображённый на рис. 2.8.12.-3. Навеску измельчённого испытуемого образца помещают в широкогорлую круглодонную или плоскодонную колбу *A* вместимостью 1000 мл, приливают 300 мл *воды Р* (или иное количество, указанное в частной статье) и закрывают резиновой пробкой *B* с обратным шариковым холодильником *C*. В пробке снизу укрепляют металлические крючки, на которые при помощи тонкой проволоки подвешивают градуированный приёмник *D* так, чтобы конец холодильника находился над воронкообразным расширением приёмника, не касаясь его. Приёмник должен свободно помещаться в горле колбы, не касаясь

стенок, и отстоять от уровня воды не менее чем на 50 мм. Цена деления градуированной части приёмника 0,025 мл.

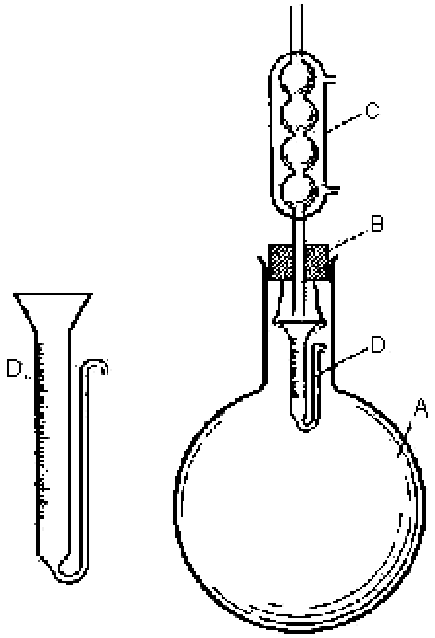


Рисунок 2.8.12.-3. – *Прибор для определения содержания эфирного масла методом В.*

Колбу с содержимым нагревают и кипятят в течение времени, указанного в частной статье на лекарственное растительное средство (лекарственное растительное сырьё). Объём масла в градуированной части приёмника *D* замеряют после окончания перегонки и охлаждения прибора до комнатной температуры (15 °C – 25 °C).

После 6-8 определений холодильник и градуированный приёмник необходимо промыть последовательно *ацетоном Р* и *водой Р*.

Объём эфирного масла в 100 г лекарственного препарата (лекарственного растительного сырья) в пересчёте на абсолютно сухое лекарственное растительное средство (лекарственное растительное сырьё) рассчитывают по формуле:

$$\frac{V \cdot 100 \cdot 100}{м \cdot (100 - W)},$$

где:

V – объём эфирного масла в миллилитрах;

м – масса сырья в граммах;

W – потеря в массе при высушивании сырья в процентах.

Метод С. Используется прибор, изображённый на рисунке 2.8.12.-4. Прибор состоит из круглодонной колбы *А* вместимостью 1000 мл, паропроводной изогнутой трубки *В*, холодильника *С*, градуированной трубки приемника *D*, оканчивающейся внизу спускным краном *Е* и сливной трубкой *F*. В верхней части приёмника имеется расширение *G* с боковой трубкой *Н*, которая служит для внесения растворителя эфирного масла в дистиллят и сообщения внутренней части прибора с атмосферой. Колба и паропроводная трубка соединяются через нормальный шлиф. Градуированная трубка имеет цену деления 0,02 мл. Для заполнения прибора водой используется резиновая трубка I с внутренним диаметром 4,5 – 5 мм, длиной 450 мм и воронка *J* диаметром 30 – 40 мм.

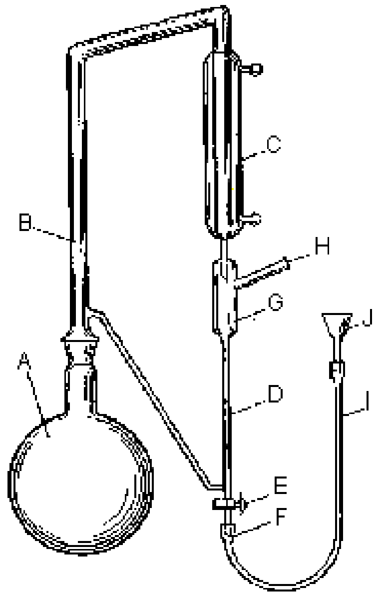


Рисунок 2.8.12.-4. – *Прибор для определения содержания эфирного масла методами C и D.*

Перед каждым определением через прибор пропускают пар в течение 15-20 мин. После 6-8 определений прибор необходимо промыть последовательно *ацетоном Р* и *водой Р*.

Навеску измельчённого сырья помещают в колбу, приливают 300 мл *воды Р*, колбу соединяют с паропроводной трубкой и заполняют *водой Р* градуированную и сливную трубки через кран при помощи трубки, оканчивающейся воронкой. Колбу с содержимым нагревают и кипятят с интенсивностью, при которой скорость стекания дистиллята составляет 60-65 капель в 1 мин в течение времени, указанного в соответствующей нормативной документации на лекарственное растительное сырьё. Через 5 мин после окончания перегонки открывают кран, постепенно спуская дистиллят так, чтобы эфирное масло заняло градуированную часть трубки приёмника и ещё через 5 мин замеряют объём эфирного масла.

Объём эфирного масла в 100 г лекарственного препарата (лекарственного растительного сырья) в пересчёте на абсолютно сухое лекарственное растительное средство (лекарственное растительное сырьё) рассчитывают по формуле:

$$\frac{V \times 100 \times 100}{м \times (100 - W)};$$

где:

V – объём эфирного масла в миллилитрах;

м – масса сырья в граммах;

W – потеря в массе при высушивании сырья в процентах.

Метод D. Используют прибор, изображённый на рисунке 2.8.12.-4. Навеску измельчённого сырья помещают в колбу, приливают 300 мл *воды Р*, колбу соединяют с паропроводной трубкой и заполняют *водой Р* градуированную и сливную трубки через кран при помощи резиновой трубки, оканчивающейся воронкой. Затем через боковую трубку при помощи пипетки вливают в приёмник около 0,5 мл *декалина Р* и точно замеряют его объём, опуская для этого уровень жидкости в градуированную часть трубки. Далее поступают, как описано в методике B.

Объём эфирного масла в 100 г лекарственного препарата (лекарственного растительного сырья) в пересчёте на абсолютно сухое лекарственное растительное средство (лекарственное растительное сырьё) рассчитывают по формуле:

$$\frac{(V_1 - V_2) \cdot 100 \cdot 100}{м \cdot (100 - W)},$$

где:

V – объём раствора масла в декалине в миллилитрах;

V_1 – объём декалина в миллилитрах;

$м$ – масса сырья в граммах;

W – потеря в массе при высушивании сырья в процентах.

Метод Е. Используется прибор, изображённый на рисунке 2.8.12.-5. Прибор состоит из круглодонной колбы с коротким горлом *A* вместимостью 1000 мл, паропроводной трубки *B*, холодильника *C*, отстойника *D* с термометром до 100 °С *E,* ртутный шарик которого находится на уровне отверстия холодильника, градуированной трубки *F* с ценой деления 0,001 мл, спускного крана *G* и сливной трубки *H*. Для заполнения прибора водой используется резиновая трубка *I* с внутренним диаметром 4,5 – 5 мм, длиной 450 мм и воронка *J* диаметром 30–40 мм.

Перед каждым определением через прибор пропускают пар в течение 15 – 20 мин. После 6 – 8 определений прибор последовательно промывают *ацетоном Р* и *водой Р*.

Навеску измельчённого сырья помещают в колбу, прибавляют необходимое количество *воды Р*. Колбу соединяют с паропроводной трубкой и заполняют *водой Р* градуированную и сливную трубки через кран при помощи резиновой трубки, оканчивающейся воронкой, до тех пор, пока в нижней воронкообразной части отстойника не наберётся слой воды высотой 8 – 12 мм. Во время перегонки этот уровень воды должен оставаться без изменения. Колбу с содержимым нагревают и кипятят в течение времени, указанного в частной статье на лекарственное растительное средство (лекарственное растительное сырьё). Во время перегонки температура в отстойнике не должна превышать 25°С. Через 5 мин после окончания перегонки открывают кран, постепенно спускают дистиллят так, чтобы эфирное масло заняло градуированную часть трубки. Ещё через 5 мин замеряют объём эфирного масла.

Объём эфирного масла в 100 г лекарственного средства (лекарственного растительного сырья) в пересчёте на абсолютно сухое лекарственное растительное средство (лекарственное растительное сырьё) рассчитывают по формуле:

$$\frac{V \cdot 100 \cdot 100}{м \cdot (100 - W)},$$

где:

V – объём эфирного масла в миллилитрах;

$м$ – масса сырья в граммах;

W – потеря в массе при высушивании сырья в процентах.

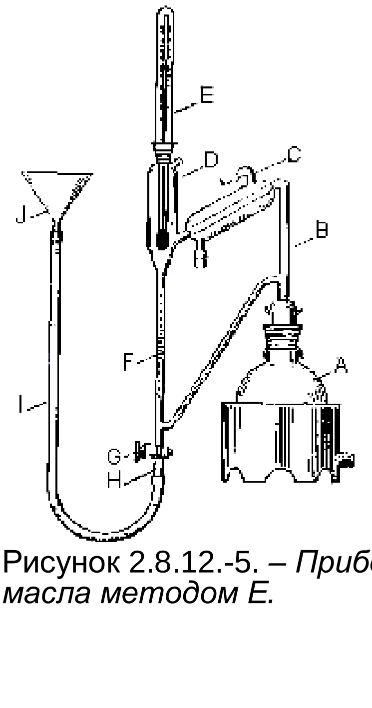


Рисунок 2.8.12.-5. – *Прибор для определения содержания эфирного масла методом Е.*

2.8.13. ОСТАТОЧНОЕ КОЛИЧЕСТВО ПЕСТИЦИДОВ

Определение Под пестицидами понимают любые вещества или смесь веществ, предназначенных для предотвращения появления, уничтожения или контроля численности любых вредителей, нежелаемых видов растений или животных, вызывающих повреждение или каким-либо другим образом оказывающих негативное влияние на производство, обработку, хранение, транспортировку или реализацию лекарственных растительных средств (лекарственного растительного сырья). Также это понятие включает в себя вещества, предназначенные для использования в качестве регуляторов роста, дефолиантов или осушителей и любые вещества, используемые для обработки растений перед сбором урожая или после него для защиты от ухудшения качества во время хранения или транспортировки.

Пределы. Если иного не указано в частной статье, лекарственное растительное сырьё должно быть исследовано на наличие следов пестицидов в пределах как минимум списка, представленного в таблице 2.8.13.-1. Пределы пестицидов, не обозначенных в таблице, наличие которых предполагается по каким-либо причинам, должны соответствовать директивам Европейского Сообщества 76/895 и 90/642, включая их дополнения и изменения. Пределы содержания пестицидов, которые не указаны ни в таблице 2.8.13.-1 ни в директивах ЕС высчитывают исходя из следующего выражения:

$$\frac{ADI \cdot M}{MDD \cdot 100},$$

где:

ADI – допустимая дневная доза, по предложению Организации по продовольствию и сельскому хозяйству ВОЗ, в миллиграммах на килограмм массы тела,

M – масса тела в килограммах (60 кг),

MDD – дневная доза лекарственного средства, в килограммах.

Если лекарственное растительное сырьё предназначено для приготовления экстрактов, настоек или других лекарственных форм, при приготовлении которых происходит изменение содержания пестицидов в конечном продукте, пределы содержания пестицидов высчитывают исходя из следующего выражения:

$$\frac{ADI \cdot M \cdot E}{MDD \cdot 100},$$

где:

E – коэффициент экстракции метода приготовления, определённый экспериментально.

Таблица 2.8.13.-1

Вещество	**Предельное содержание (мг/кг)**
Алахлор	0,02
Алдрин и Диэлдрин (сумма)	0,05
Азинфос-метил	1,0
Бромпропилат	3,0
Хлордан (сумма цис- и транс- и оксихлордана)	0,05
Хлорфенвинфос	0,5
Хлорпирифос	0,2
Хлорпирифос-метил	0,1
Циперметрин (и изомеры)	1,0

ДДТ (сумма п,п′-ДДТ, *о*,п′-ДДТ, п,*п′*-ДДЕ и *п*,п′-ТДЕ)	1,0
Дельтаметрин	0,5
Диазинон	0,5
Дихлорфос	1,0
Дитиокарбоматы (в перерасчёте на CS_2)	2,0
Эндосульфан (сумма изомеров и Эндосульфан сульфат)	3,0
Эндрин	0,05
Этион	2,0
Фенитротион	0,5
Фенвалерат	1,5
Фонофос	0,05
Гептахлор (сумма Гептахлора и Гептахлорепоксида)	0,05
Гексахлорбензол	0,1
Гексахлорциклогексан, изомеры (кроме γ)	0,3
Линдан (γ-Гексахлорциклогексан)	0,6
Малатион	1,0
Метидатион	0,2
Паратион	0,5
Паратион-метил	0,2
Перметрин	1,0
Фозалон	0,1
Пиперонилбутоксид	3,0
Пиримифос-метил	4,0
Пиретрины (сумма)	3,0
Квинтоцен (сумма квинтоцена, пентахлоранилина и метилпентахлорфенилсульфида)	1,0

Компетентный уполномоченный орган может частично или полностью освободить от проведения испытаний на содержание пестицидов при условии, что известна и может быть проверена полная история (природа и количество использованных пестицидов, дата каждой обработки во время выращивания и после сбора урожая) данной партии.

Поставщик культивируемого лекарственного растительного сырья должен предоставить протокол исследований на поставляемую партию лекарственного растительного сырья, в котором указываются использованные пестициды и их остаточное количество.

Для дикорастущих лекарственных растений исследование на остаточное количество пестицидов не требуется.

Отбор проб

Методика. Из тары вместимостью до 1 кг берут 1 пробу, достаточную для проведения всех испытаний, из тщательно перемешенного общего количества. Из тары вместимостью от 1 кг до 5 кг берут три равные пробы из верхней, средней и нижней частей тары, каждая проба должна быть достаточная для проведения всех испытаний. Пробы тщательно перемешивают, и из полученной массы берут пробу, достаточную для проведения всех испытаний. Из тары вместимостью более 5 кг берут три пробы по 250 г из верхней, средней и нижней части тары. Пробы тщательно смешивают, и из полученной массы берут пробу, необходимую для проведения испытаний.

Количество проб. Если количество тарных мест (*n*) составляет 3 и менее, пробы отбираются из каждого тарного места так, как указано выше. Если количество тарных мест более трёх, то пробы отбирают так, как описано выше из $\sqrt{n}$ + 1 мест, округляя, если необходимо, полученное число до целого значения.

Пробы должны анализироваться немедленно во избежание возможного разрушения остатков пестицидов. Если это невозможно, пробы сохраняют в герметичных

контейнерах, пригодных для контакта с пищевыми продуктами, при температуре ниже 0ºC в защищённом от света месте.

Реактивы. Все реактивы и растворители не должны содержать примесей, особенно пестицидов, которые могут влиять на результат анализа. Как правило, должны использоваться растворители специального качества или, если это невозможно, свежеперегнанные в приборах, сделанных из стекла. Во всех случаях должен проводиться контрольный опыт.

Оборудование. Чтобы гарантировать чистоту оборудования, и особенно изделий из стекла, от пестицидов, его тщательно очищают, например, отмачивают в течение минимум 16 ч в растворе детергентов, не содержащих фосфор, ополаскивают их большим количеством *дистиллированной воды Р* и промывают *ацетоном Р* и *гексаном Р* или *гептаном Р*.

Качественное и количественное определение остатков пестицидов. Используемые аналитические методики должны быть валидированы. В частности, они должны удовлетворять следующим критериям:

- выбранный метод, особенно стадии очистки, должен быть подходящим для комбинации пестицид-матрица и не должен быть чувствительным на наличие коэкстрактивных веществ; пределы обнаружения и количественного определения должны быть измерены для каждой комбинации пестицид-матрица;
- должно определяться от 70 до 110% каждого анализируемого пестицида;
- сходимость определения метода должна быть не менее значений, обозначенных в таблице 2.8.13.-2;
- воспроизводимость метода должна быть не менее значения, указанного в таблице 2.8.13.-2;
- концентрация испытуемых и эталонных растворов и параметры приборов должны быть такими, чтобы попадать в диапазон линейности ответа используемого детектора.

Таблица 2.8.13.-2

Концентрация пестицидов (мг/кг)	Сходимость (отклонение, ± мг/кг)	Воспроизводимость (отклонение, ± мг/кг)
0,010	0,005	0,01
0,100	0,025	0,05
1,000	0,125	0,25

ИСПЫТАНИЯ НА СОДЕРЖАНИЕ ПЕСТИЦИДОВ

ИНСЕКТИЦИДЫ: ХЛОРОРГАНИЧЕСКИЕ, ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИЕ И ИРЕТРОИДНЫЕ
(*Раздел носит информационный характер*)

Данные методики могут быть использованы вместе с методами, описанными выше. В зависимости от испытуемого вещества, методы, описанные ниже, могут быть при необходимости модифицированы. Возможно использование другой колонки с отличающейся полярностью или другой способ детектирования (масс спектрометрия 2.2.43) или другие методы (иммунохимические методы 2.7.1) для подтверждения полученных результатов.

Данная методика подходит для анализа образцов лекарственных растительных средств (лекарственного растительного сырья) влажностью менее 15 %. Образцы с более высоким содержанием воды должны быть высушены, в условиях минимального воздействия на содержание пестицидов в таких условиях, чтобы процесс сушки не влиял в значительной степени на содержание пестицидов.

1. ЭКСТРАКЦИЯ

К 10 г грубо измельчённого образца добавляют 100 мл *ацетона Р* и оставляют на 20 мин. Добавляют 1 мл раствора, содержащего 1,8 мкг/мл *карбофенотиона Р* в *толуоле Р*. Гомогенизируют, используя высокоскоростной смеситель, в течение 3 мин. Отфильтровывают и промывают фильтр дважды порциями *ацетона Р* по 25 мл.

Фильтрат и промывочный растворитель объединяют и отгоняют, используя ротационный испаритель, при температуре не выше 40°С, до практически полного испарения растворителя. К остатку добавляют несколько миллилитров *толуола Р* и нагревают снова до тех пор, пока весь ацетон не будет отогнан. Остаток растворяют в 8 мл *толуола Р*. Фильтруют через мембранный фильтр (45 мкм), ополаскивают колбу и фильтр *толуолом Р* и доводят объём фильтрата до 10,0 мл тем же растворителем (раствор А).

2. ОЧИСТКА

2.1. Хлорорганические, фосфорорганические, пиретроидные инсектициды. Испытание осуществляется с помощью эксклюзионной хроматографии (*2.2.30*).

При хроматографировании могут использоваться:

- колонка из нержавеющей стали длиной 0,30 м и внутренним диаметром 7,8 мм, наполненная *сополимером стирол-дивинилбензолом Р* (5 мкм);
- *толуол Р* как подвижная фаза при скорости протока 1 мл/мин.

Подготовка колонки. Хроматографируют 100 мкл раствора, содержащего 0,5 г/л *метилового красного Р* и 0,5 г/л *орацетового синего 2Р Р* в *толуоле Р*. Изменение цвета элюата с оранжевого на синий должно происходить при объёме элюирования 10,3 мл. Если необходимо откалибровать колонку, используют растворы в *толуоле Р* инсектицида с наименьшей молекулярной массой (например, дихлофос) и с наибольшей молекулярной массой (например, дельтаметрин). Определяют, какая фракция элюата содержит оба инсектицида.

Очистка испытуемого раствора. Хроматографируют подходящий объём раствора А (от 100 мкл до 500 мкл). Собирают фракцию, как описано выше (фракция, которая содержит оба инсектицида) (раствор В). Фосфорорганические инсектициды обычно элюируются между 8,8 мл и 10,9 мл. Хлорорганические и пиретроидные инсектициды элюируются обычно между 8,5 мл и 10,3 мл.

2.2. Хлорорганические и пиретроидные инсектициды. В хроматографическую колонку длиной 0,10 м и с внутренним диаметром 5 мм помещают немного обезжиренной ваты и 0,5 г силикагеля, обработанного следующим образом: нагревают *силикагель для хроматографии Р* при температуре 150 °С как минимум 4 ч. Охлаждают и добавляют по каплям *воду Р* в количестве 1,5 % массы силикагеля, интенсивно перемешивая до полного разрушения агломератов, и продолжают перемешивать 2 ч с помощью механического аппарата для встряхивания. Обрабатывают колонку 1,5 мл *гексана Р*. Также могут быть использованы набитые колонки, содержащие около 0,50 г силикагеля, при условии, что возможность использования их обоснована.

Концентрируют раствор В в токе *гелия для хроматографии Р* или *бескислородного азота Р* практически досуха и растворяют в подходящем объёме *толуола Р* (от 200 мкл до 1 мл в зависимости от объёма, использованного при приготовлении раствора В). Количественно переносят раствор на колонку и хроматографируют, используя 1,8 мл *толуола Р* в качестве подвижной фазы. Элюат собирают (раствор С).

3. КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ

3.1. Фосфорорганические инсектициды. Исследование проводят с помощью газовой хроматографии (*2.2.28*) используя *карбофенотион Р* в качестве внутреннего стандарта. Возможно понадобится второй внутренний стандарт в случае идентификации возможных примесей со временем удерживания, которое соответствует карбофенотиону.

Испытуемый раствор. Концентрируют раствор В в токе *гелия для хроматографии Р* практически досуха и растворяют в 100 мкл *толуола Р*.

Раствор сравнения. Готовят, по крайней мере, три раствора определяемых инсектицидов и карбофенотиона в *толуоле Р* с концентрациями, подходящими для построения калибровочного графика.

При хроматографировании могут использоваться:

- капиллярная колонка длиной 30 м и с внутренним диаметром 0,32 мм, внутренняя стенка которой покрыта слоем в 0,25 мкм *поли(диметил)силоксана Р*;
- *водород для хроматографии Р* как газ-носитель; другие газы, такие как *гелий для хроматографии Р* или *азот для хроматографии Р* также могут быть использованы, при условии, что возможность использования их обоснована;
- фосфоро-азотный пламенно-ионизационный детектор или атомно-эмиссионный детектор,

поддерживают температуру колонки 80 °С в течение 1 мин, затем поднимают её со скоростью 30 °С до 150 °С, при температуре 150 °С колонку выдерживают 3 мин, после чего поднимают температуру со скоростью 4 °С до 280 °С и поддерживают эту температуру 1 мин; температуру инжектора поддерживают 250 °С, а температуру детектора 275 °С. Вносят необходимый объём каждого раствора. При условии соблюдения вышеуказанных условий проведения хроматографии относительное время удерживания веществ будет близким к значениям, указанным в таблице 2.8.13.-3. Подсчитывают содержание каждого инсектицида исходя из площадей пиков и концентраций растворов.

Таблица 2.8.13.-3

Относительные времена удерживания инсектицидов

Вещество	**Относительное время удерживания**
Дихлофос	0,20
Фонофос	0,50
Диазинон	0,52
Паратион-метил	0,59
Хлорпирифос-метил	0,60
Пиримифос-метил	0,66
Малатион	0,67
Паратион	0,69
Хлорпирифос	0,70
Метидатион	0,78
Этион	0,96
Карбофенотион	1,00
Азинфос-метил	1,17
Фозалон	1,18

3.2. Хлорорганические и пиретроидные инсектициды. Исследование проводят с помощью газовой хроматографии (*2.2.28*), используя карбофенотион как внутренний стандарт. Возможно понадобится второй внутренний стандарт в случае идентификации возможных примесей со временем удерживания, которое соответствует карбофенотиону.

Испытуемый раствор. Концентрируют раствор С в токе *гелия для хроматографии Р* или *бескислородного азота Р* практически досуха и растворяют в 500 мкл *толуола Р*.

Раствор сравнения. Готовят, по крайней мере, три раствора определяемых инсектицидов и карбофенотиона в *толуоле Р* с концентрациями, подходящими для построения калибровочного графика.

При хроматографировании могут использоваться:

- капиллярная колонка длиной 30 м и с внутренним диаметром 0,32 мм, внутренняя стенка которой покрыта слоем в 0,25 мкм *поли(диметил)(дифенил)силоксана Р*;

- *водород для хроматографии Р* как газ-носитель; другие газы, такие как *гелий для хроматографии Р* или *азот для хроматографии Р* также могут быть использованы, при условии, что возможность использования их обоснована;
- детектор электронного захвата;
- устройство для прямого холодного ввода пробы в колонку,

поддерживают температуру колонки 80 ºC в течение 1 мин, затем поднимают её со скоростью 30 ºC/мин до 150 ºC, при температуре 150 ºC колонку выдерживают 3 мин, после чего поднимают температуру со скоростью 4 ºC/мин до 280 ºC и поддерживают эту температуру 1 мин; температуру инжектора поддерживают 250 ºC, а температуру детектора 275 ºC. Вносят необходимый объём каждого раствора. При условии соблюдения вышеуказанных условий проведения хроматографии относительное время удерживания веществ будет близким к значениям, указанным в таблице 2.8.13.-4. Подсчитывают содержание каждого инсектицида исходя из площадей пиков и концентраций растворов.

Таблица 2.8.13.-4

Относительные времена удерживания инсектицидов

Вещество	Относительное время удерживания
α-Гексахлорциклогексан	0,44
Гексахлорбензол	0,45
β-Гексахлорциклогексан	0,49
Линдан	0,49
δ-Гексахлорциклогексан	0,54
ε-Гексахлорциклогексан	0,56
Гептахлор	0,61
Алдрин	0,68
цис-Гептахлорэпоксид	0,76
о,п'-ДДЕ	0,81
α-Эндосульфан	0,82
Диэлдрин	0,87
п,п'-ДДЕ	0,87
о,п'-ДДД	0,89
Эндрин	0,91
β-Эндосульфан	0,92
о,п'-ДДТ	0,95
Карбофенотион	1,00
п,п'-ДДТ	1,02
цис-Перметрин	1,29
транс-Перметрин	1,31
Циперметрин*	1,40
Фенвалерат*	1,47 и 1,49
Дельтаметрин	1,54
* Вещество даёт несколько пиков.	

Допускается использование других детекторов кроме пламеннофотометрических.

2.8.14. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДУБИЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ

Все операции экстракции и растворения проводят в защищённом от света месте.

В круглодонную колбу вместимостью 250 мл всыпают указанное в частной статье количество измельчённого образца лекарственного растительного сырья (180) или экстракта и добавляют 150 мл *воды Р*. Нагревают на водяной бане в течение 30 мин. Охлаждают под проточной водой и количественно переносят в мерную колбу вместимостью 250 мл. Ополаскивают круглодонную колбу и сливают промывные воды в мерную колбу, после чего объём доводят *водой Р* до 250,0 мл. Дают осесть твёрдым частичкам и фильтруют жидкость через фильтровальную бумагу диаметром 125 мм. Первые 50 мл фильтрата отбрасывают.

В случае жидкого экстракта или настойки разбавляют указанное количество жидкого экстракта или настойки водой до 250,0 мл. Раствор фильтруют через фильтровальную бумагу диаметром 125 мм. Первые 50 мл фильтрата отбрасывают.

Общее количество полифенолов. Разбавляют 5,0 мл фильтрата до 25,0 мл *водой Р*. Смешивают 2,0 мл полученного раствора с 1,0 мл *фосфорномолибденовольфрамового реагента Р* и 10,0 мл *воды Р* и доводят объём раствора до 25,0 мл раствором *натрия карбоната Р* концентрацией 290 г/л. Через 30 мин измеряют оптическую плотность (*2.2.25*) при длине волны 760 нм (A_1), используя *воду Р* как раствор сравнения.

Полифенолы, не адсорбируемые кожным порошком. К 10,0 мл фильтрата добавляют 0,10 г *кожного порошка ФСО* и интенсивно перемешивают в течение 60 мин. Отфильтровывают и разбавляют 5,0 мл фильтрата до 25,0 мл *водой Р*. Смешивают 2 мл этого раствора с 1,0 мл *фосфорномолибденовольфрамового реагента Р* и 10,0 мл *воды Р* и объём доводят до 25,0 мл раствором *натрия карбоната Р* концентрацией 290 г/л. Через 30 мин измеряют оптическую плотность (*2.2.25*) при длине волны 760 нм (A_2), используя *воду Р* как раствор сравнения.

Стандарт. Непосредственно перед использованием растворяют 50,0 мг *пирогаллола Р* в *воде Р* и доводят объём раствора до 100,0 мл тем же растворителем. Разбавляют 5,0 мл этого раствора до 100,0 мл *водой Р*. Смешивают 2,0 мл полученного раствора с 1,0 мл *фосфорномолибденовольфрамового реагента Р* и 10,0 мл воды и доводят объём до 25,0 мл раствором *натрия карбоната Р* с концентрацией 290 г/л. Через 30 мин измеряют оптическую плотность при длине волны 760 нм (A_3), используя *воду Р* как раствор сравнения.

Рассчитывают процентное содержание дубильных веществ в пересчёте на пирогаллол по формуле:

$$\frac{62{,}5 \cdot (A_1 - A_2) \cdot м_2}{A_3 \cdot м_1},$$

где:

$м_1$ – масса взятого образца для анализа, в граммах;

$м_2$ – масса пирогаллола, в граммах.

Допускается проводить определение дубильных веществ по методике, указанной в частной статье.

2.8.15. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЯ ГОРЕЧИ

Показатель горечи обратно пропорционален разбавлению соединения, жидкости или экстракта, при котором всё ещё ощущается горький вкус. Он определяется по отношению к показателю горечи хинина гидрохлорида, значение которого принято за 200 000.

Определение поправочного коэффициента

Дегустационная комиссия должна состоять, по крайней мере, из 6 человек. Перед дегустацией рот необходимо ополаскивать *водой Р*.

Для того чтобы скорректировать индивидуальные различия среди членов дегустационной комиссии при определении показателя горечи, необходимо определять поправочный коэффициент для каждого члена комиссии.

Основной раствор. Растворяют 0,100 г *хинина гидрохлорида Р* в небольшом количестве *воды Р* и доводят объём раствора до 100,0 мл *водой Р*. Отбирают 1,0 мл полученного раствора и разбавляют его до 100,0 мл *водой Р*.

Раствор сравнения. Готовят серию разбавлений, поместив в первую пробирку 3,6 мл основного раствора, а в последующих пробирках увеличивают объём основного раствора на 0,2 мл до объёма 5,8 мл. Объём каждой пробирки доводят до 10,0 мл *водой Р*.

Находят наименее концентрированный горький раствор. Для этого берут 10 мл наиболее разбавленного раствора в рот и перекатывают его со стороны в сторону у корня языка в течение 30 с. Если в растворе не чувствуется горького вкуса, его выплёвывают и ждут 1 мин. После этого прополаскивают рот *водой Р*. Через 10 мин повторить испытание со следующей по возрастанию концентрацией хинина гидрохлорида.

Рассчитывают поправочный коэффициент для каждого члена дегустационной комиссии по формуле:

$$k = \frac{n}{5{,}00},$$

где:

n – количество миллилитров основного раствора в калибровочном растворе минимальной концентрации, в котором был почувствован горький вкус.

Лица, не почувствовавшие горечь в самом концентрированном растворе, должны быть исключены из состава комиссии.

Пробоподготовка

Если необходимо, измельчают образец в порошок. К 1,0 г образца добавляют 100,0 мл кипящей *воды Р*. Нагревают на водяной бане в течение 30 мин, постоянно взбалтывая. Дают остыть и доводят объём *водой Р* до 100,0 мл. Тщательно перемешивают и отфильтровывают, отбрасывая первые 2 мл фильтрата. Этот раствор обозначается как С-1 (К-1) и имеет фактор разбавления (DF, ФР) равный 100.

Если определяется горечь жидкости, 1 мл её разбавляют подходящим растворителем до 100 мл и полученный раствор обозначают как С-1 (К-1).

Определение степени горечи.

Испытуемые растворы.

10,0 мл раствора С-1 разбавленные *водой Р* до 100 мл: С-2 (DF = 1000)

10,0 мл раствора С-2 разбавленные *водой Р* до 100 мл: С-3 (DF = 10 000)

20,0 мл раствора С-3 разбавленных *водой Р* до 100 мл: С-3а (DF = 50 000)

10,0 мл раствора С-3 разбавленных *водой Р* до 100 мл: С-4 (DF = 100 000)

Начиная с раствора С-4, каждый член комиссии определяет раствор с минимальной концентрацией, который имеет горький вкус. Этот раствор обозначается D и имеет степень разбавления, которая обозначается Y.

Исходя из раствора D, приготавливается следующий ряд разбавлений:

Раствор D (мл)	1.2	1.5	2.0	3.0	6.0	8.0
Вода Р (мл)	8.8	8.5	8.0	7.0	4.0	2.0

Определяют объём (в миллилитрах) раствора D, который, будучи разбавленными до 10 мл *водой Р*, всё ещё имеют горький вкус (X).

Подсчитывают показатель горечи для каждого члена дегустационной комиссии по формуле:

$$\frac{Y \cdot k}{X \cdot 0{,}1}.$$

Показатель горечи образца считается как среднее арифметическое всех полученных результатов.

2.8.16. СУХОЙ ОСТАТОК ЭКСТРАКТОВ

В плоскодонную чашку диаметром около 50 мм и высотой около 30 мм быстро вносят 2,00 г или 2,0 мл испытуемого экстракта. Выпаривают досуха на водяной бане и сушат при температуре (100 – 105) ºС в течение 3 ч. Охлаждают в эксикаторе над *фосфора (V) оксидом Р* или *силикагелем безводным Р* и взвешивают. Результат рассчитывают как массовый процент или в граммах на литр.

Допускается использовать в качестве осушающего агента *кальция хлорид безводный Р*.

2.8.17. ПОТЕРЯ В МАССЕ ПРИ ВЫСУШИВАНИИ ЭКСТРАКТА

В плоскодонную чашку диаметром 50 мм и высотой 30 мм быстро взвешивают 0,50 г мелко измельчённого испытуемого экстракта. Сушат при температуре (100 – 105) ºС в течение 3 ч. Охлаждают в эксикаторе над *фосфора (V) оксидом Р* или *силикагелем безводным Р* и взвешивают. Результат рассчитывают в массовых процентах.

Допускается использовать в качестве осушающего агента *кальция хлорид безводный Р*.

2.8.18. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ЭКСТРАКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

Около 1 г измельчённого сырья (точная навеска), просеянного сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм, помещают в коническую колбу вместимостью 200-250 мл, прибавляют 50 мл растворителя, указанного в нормативной документации на лекарственное сырьё, колбу закрывают пробкой, взвешивают (с погрешностью ±0,01 г) и оставляют на 1 ч. Затем колбу соединяют с обратным холодильником, нагревают, поддерживая слабое кипение, в течение 2 ч. После охлаждения колбу с содержимым вновь закрывают той же пробкой, взвешивают и потерю в массе восполняют растворителем. Содержимое колбы тщательно взбалтывают и фильтруют через сухой бумажный фильтр в сухую колбу вместимостью 150-200 мл. 25 мл фильтрата пипеткой переносят в предварительно высушенную при температуре (100 – 105)°С до постоянной массы и точно взвешенную фарфоровую чашку диаметром 7-9 см и выпаривают на водяной бане досуха. Чашку с остатком сушат при температуре (100 – 105)°С до постоянной массы, после чего охлаждают в течение 30 мин в эксикаторе, на дне которого находится *хлорид кальция безводный Р*, и немедленно взвешивают.

Проводят два параллельных определения.

Содержимое экстрактивных веществ в процентах в пересчёте на абсолютно сухое сырьё вычисляют по формуле:

$$\frac{м \cdot 200 \cdot 100}{м_1 \cdot (100 - W)},$$

где:

м – масса сухого остатка в граммах;
$м_1$ – масса сырья в граммах;
W – потеря в массе при высушивании сырья в процентах.

За окончательный результат испытания принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений.

Для спирторастворимых веществ рекомендуется использовать растворитель с концентрацией, обозначенной в методике испытаний на конкретный вид лекарственного растительного сырья; для водорастворимых веществ рекомендуется использовать в

качестве растворителя воду. Возможно также использование других растворителей, указанных в методике испытаний.

2.8.19. ПРАВИЛА ПРИЁМКИ И МЕТОДЫ ОТБОРА ПРОБ

Отбор проб лекарственного растительного сырья «ангро»

Приёмку лекарственного растительного сырья производят партиями.

Партией считают любое количество цельного, обмолоченного, измельченного, прессованного лекарственного растительного сырья, однородного по способу подготовки и показателям качества, одного наименования и оформленного одним документом, удостоверяющим его качество. Документ, удостоверяющий качество партии должен содержать следующие данные:

- номер и дату выдачи документа;
- наименование и адрес отправителя;
- наименование сырья;
- номер партии;
- массу партии;
- год и месяц сбора или заготовки;
- район заготовки (для сырья из дикорастущих растений);
- результаты испытаний качества сырья;
- наименование нормативной документации на сырьё;
- подпись лица, ответственного за качество сырья, с указанием фамилии и должности.

Каждую единицу продукции подвергают внешнему осмотру для установления соответствия упаковки и маркировки требованиям нормативной документации. Обращают внимание на правильность упаковки, состояние тары (отсутствие подмочки, подтеков и других повреждений, отрицательно влияющих на качество и сохранность сырья).

Для проверки соответствия качества сырья требованиям нормативной документации отбирают выборку из неповрежденных единиц продукции, взятых из разных мест партии в количестве, указанном в табл. 2.8.19.-1. Проверку качества сырья в поврежденных единицах продукции производят отдельно от неповрежденных, вскрывая каждую единицу продукции.

Таблица 2.8.19.-1

№ п/п	Количество единиц продукции сырья	Объём выборки
1	1 – 5	Все транспортные единицы
2	6 – 50	5 транспортных единиц
3	Свыше 50	10 % транспортных единиц от партии

Примечание. Неполные 10 единиц продукции приравнивают к 10 единицам (например, при наличии в партии 51 единицы продукции объём выборки составляет 6 единиц).

Попавшие в выборку единицы продукции вскрывают и путем внешнего осмотра определяют: однородность сырья по способу подготовки (цельное, измельченное, прессованное и т. д.), цвету, запаху, засоренности; наличие недопустимых примесей - плесени, гнили, устойчивого постороннего запаха, не исчезающего при проветривании; засоренность ядовитыми растениями и посторонними примесями (камни, стекло, помет грызунов и птиц и т.д.). Одновременно невооруженным глазом и с помощью лупы (5—10 X) определяют наличие амбарных вредителей

При установлении (внешний осмотр) неоднородности сырья, наличия плесени и гнили, засоренности посторонними растениями в количествах, явно превышающих

допустимые примеси и т. д. вся партия должна быть рассортирована, после чего вторично предъявлена к сдаче.

При обнаружении в сырье затхлого, устойчивого постороннего запаха, не исчезающего при проветривании, ядовитых растений и посторонних примесей (помет грызунов и птиц, стекло и др.), зараженности амбарными вредителями II и III степеней, партия сырья не подлежит приемке.

Из каждой единицы продукции, отобранной для вскрытия, берут, избегая измельчения, 3 точечные пробы: сверху, снизу и из середины. Из мешков, тюков и кип точечные пробы отбирают на глубине не менее 10 см рукой сверху, затем, после распарывания по шву, из середины и снизу; точечные пробы семян и сухих плодов отбирают зерновым щупом. Из сырья, упакованного в ящик, первую точечную пробу отбирают из верхнего слоя, вторую - после удаления сырья примерно до половины ящика и третью - со дна ящика. Точечные пробы должны быть примерно одинаковыми по массе. Из всех точечных проб, осторожно перемешивая, составляют объединенную пробу.

В случае если масса объединённой пробы недостаточна для проведения всех испытаний, отбор точечных проб повторяют.

Из объединённой пробы методом квартования выделяют следующие пробы в приведённой ниже последовательности:

- пробу для определения степени зараженности амбарными вредителями массой 500 г для мелких видов сырья и массой 1000 г для крупных видов сырья;
- пробу для определения подлинности, измельченности и содержания примесей в соответствии с таблицей 2.8.19-2.

Для этого лекарственное растительное сырьё разравнивают на гладкой, чистой, ровной поверхности в виде квадрата по возможности тонким равномерным по толщине слоем и по диагонали делят на четыре треугольника. Два противоположных треугольника удаляют, а два оставшихся соединяют вместе и перемешивают. Эту процедуру повторяют до тех пор, пока не останется количество сырья в двух противоположных треугольниках, соответствующее массе заданных проб. Допустимые отклонения в массе каждой из проб не должны превышать ±10%.

Оставшуюся часть объединенной пробы измельчают ножницами или секатором до размеров частиц около 1 см, перемешивают и выделяют методом квартования аналитические пробы для определения:

- влажности (сразу после отбора пробу упаковывают герметически) в соответствии с таблицей 2.8.19-2;
- золы и действующих веществ в соответствии с таблицей 2.8.19-2;
- микробиологической чистоты массой 50 – 200 г;
- радионуклидов в соответствии с указаниями таблицы 2.8.19.-3.
- пестицидов и токсических веществ массой 1 кг

Таблица 2.8.19.-2

Наименование сырья	Масса пробы г, для определения		
	Подлинности, измельчённости и содержания примесей	Влажности	Содержания золы и действующих веществ
почки березовые	50	25	25
почки сосновые	200	25	100
листья цельные, кроме нижеперечисленных:	200	25	150
лист сенны	100	15	50
лист толокнянки и брусники	50	25	50
листья резаные, обмолоченные	5	25	100

цветки, кроме нижеперечисленных:	200	25	50
цветки полыни цитварной	25	15	50
цветки ноготков, кукурузные столбики с рыльцами	100	25	50
цветки бузины черной	20	15	25
цветки ромашки аптечной	50	25	100
цветки ромашки далматской	300	25	50
травы цельные, побеги, кроме нижеперечисленных:	300	50	200
трава душицы	25	15	50
побеги анабазиса	50	25	100
травы резаные, обмолоченные	50	25	100
сочные плоды, кроме нижеперечисленных:	100	50	50
плоды шиповника	200	25	50
плоды стручкового перца	300	25	150
сухие плоды и семена, кроме нижеперечисленных:	200	25	50
семена дурмана индейского, термопсиса, льна	50	25	100
плоды амми и семена джута	10	25	100
клубни, корни и корневища цельные, кроме нижеперечисленных:	300	50	200
корневище и корень марены, корневище лапчатки	200	50	100
клубни салепа	100	25	50
корневище и корень девясила	600	50	100
корневище мужского папоротника и корень ревеня	1000	100	300
корень мыльный туркестанский	10000	200	-
корень солодки очищенный	5000	100	500
корень солодки неочищенный, корень барбариса	2000	100	200
корни и корневища резаные, дробленые	100	25	100
Корни и корневища в порошке	50	15	25
кора цельная	400	50	100
кора резаная	100	25	50
прочее растительное сырье:			
ликоподий	50	25	25

рожки спорыньи	50	25	100
березовый гриб — чага	2000	500	100
морская капуста — слоевища	3000	500	1000
морская капуста шинкованная	500	100	300
морская капуста — порошок	100	50	200
сырье животного происхождения:			
бадяга	100	25	-

Таблица 2.8.19.-3

№ п/п	Наименование сырья	Масса средней пробы (не менее), г
1	листья	600
2	трава	600
3	цветки	600
4	плоды	1000
5	семена	1000
6	кора	1000
7	корни и корневища	1000
8	сборы	600
9	прочее	1000

Пробу для установления степени зараженности амбарными вредителями помещают в плотно закрывающуюся ёмкость. Пробы для определения радионуклидов, пестицидов, токсических веществ и микробиологической чистоты упаковывают каждую в полиэтиленовый или многослойный бумажный пакет. К пакету или емкости прикрепляют этикетку, такую же этикетку вкладывают внутрь мешка или емкости. На этикетке указывают следующие данные: наименование сырья; наименование поставщика; номер партии; массу партии; дату отбора пробы, фамилию и должность лица, отобравшего пробу.

Аналитические пробы должны быть взвешены с погрешностью ±:

0,01 – при массе пробы до 50 г;

0,1 – при массе пробы 50 – 500 г;

1,0 – при массе пробы 50 – 1000 г;

5,0 – при массе пробы более 1000 г.

При установлении в результате испытаний несоответствия качества сырья требованиям нормативной документации проводят его повторную проверку. Для повторного анализа от невскрытых единиц продукции отбирают выборку в соответствии с таблицей 2.8.19.-1. Результаты повторного анализа являются окончательными и распространяются на всю партию.

После отбора проб составляется акт отбора образцов, в котором указывается:

Наименование лекарственного растительного сырья;

Номер партии;

Масса партии;

Дата отбора проб;

Фамилия лица, отбиравшего пробы

Примечание. Отбор проб корня женьшеня осуществляется в соответствии с частной фармакопейной статьёй.

Отбор проб фасованной продукции

Лекарственное растительное сырье и сборы расфасовываются в пачки, пакеты, фильтр-пакеты в цельном, резаном, дробленом, порошкованном, резано-прессованном виде, а также в форме брикетов для использования в качестве лекарственных средств.

Приемку фасованной продукции проводят сериями. Под серией понимают определённое количество однородного по всем показателям фасованного лекарственного растительного средства (цельное, измельченное, порошок), произведённое в течение одного технологического цикла, оформленное одним документом качества. Серия формируется из одной или нескольких партий лекарственного растительного сырья.

Единицы продукции в выборку необходимо отбирать из разных мест контролируемой серии.

Объем выборки зависит от объема серии и указан в таблице 2.8.19.-4.

Таблица 2.8.19.-4

Количество транспортных упаковок	Объём выборки (транспортных упаковок)	Объём выборки (потребительских упаковок)
1 – 5	Все транспортные упаковки	По 2 потребительские упаковки при массе фасовки 40 г и более
6 – 150	5 транспортных упаковок	
151 – 500	10 транспортных упаковок	По 4 потребительские упаковки при массе фасовки 35 г и менее
501 и более	Рассчитывается по формуле $0,4\sqrt{n}$	

При отборе серии более 500 транспортных единиц для расчета количества транспортных единиц при вскрытии используют формулу:

$$0,4\sqrt{n},$$

где:

n – количество упаковочных единиц в одной серии.

Полученное в результате подсчёта по формуле дробное число округляют в сторону увеличения до целого числа, оно должно быть не менее 3 и не более 30. В случае недостаточного количества упаковочных единиц для проведения испытания, повторно отбирают упаковочные единицы, как указано выше.

Отобранные потребительские упаковки составляют объединённую пробу.

Из объединённой пробы выделяются пробы для определения:

- допустимых отклонений на промышленное фасование – 10 невскрытых пачек или пакетов, 10 невскрытых контурных ячейковых упаковок, брикетов, 10 невскрытых пачек с фильтр-пакетами;
- микробиологической чистоты – 5 невскрытых потребительских упаковок общей массой не менее 50 г;
- радионуклидов в соответствии с таблицей 2.8.19.-5
- аналитические пробы в соответствии с таблицей 2.8.19.-2
- пестицидов и токсических веществ - 10 невскрытых потребительских упаковок общей массой не менее 500 г;

Таблица 2.8.19.-5

Количество потребительских упаковок, шт.	Объём выборки, шт.
До 100	2 (но не менее 70 г)
От101 до 200	3 (но не менее 70 г)
От 201 до 500	4 (но не менее 70 г)

От 501 и более	5 (но не менее 70 г)

Отобранные упаковки объединённой пробы, после выделения проб для определения микробиологической чистоты, пестицидов, токсических веществ и отклонения в массе, вскрывают, содержимое высыпают на гладкую, чистую, ровную поверхность, тщательно перемешивают и методом квартования выделяют пробы, соответствующие по массе одной из заданных проб (таблица 2.8.19.-2).

Определение допустимых отклонений на промышленное фасование определяют следующим образом.

Анализ лекарственного растительного сырья и сборов в пачках и пакетах, а также фасованного «ангро»:

испытания проводят на 10 упаковках, каждую из которых взвешивают с погрешностью ± 0,01 г. Массу содержимого упаковки устанавливают как разность между массой сырья в упаковке и массой тщательно очищенной от содержимого упаковки.

Анализ лекарственного растительного сырья и сборов в фильтр-пакетах проводят по следующей методике:

10 пачек с фильтр-пакетами пробы для определения допустимых отклонений массы содержимого упаковки при промышленном фасовании вскрывают, отбирают произвольно 20 фильтр-пакетов, содержимое фильтр-пакетов высыпают и взвешивают с погрешностью ± 0,01 г. Вычисляют отклонение массы порошка в фильтр-пакете от номинальной.

Анализ лекарственного растительного сырья и сборов в брикетах проводят по следующей методике: 10 контурных ячейковых упаковок, брикетов пробы для определения допустимых отклонений при промышленном фасовании вскрывают с погрешностью ± 0,01 г. Вычисляют отклонения массы брикета от номинальной.

Допустимые отклонения массы содержимого упаковки при промышленном фасовании лекарственного растительного сырья обозначены в таблице 2.8.19.-6.

Таблица 2.8.19.-6

Диапазон измеряемых масс, г	Допустимые отклонения ± %	
	Для одной упаковки	Для десяти упаковок
До 100	5	1,6
От 101 до 200	3	0,9
От 201 до 1000	2	0,6
От 1001 до 10000	1	0,3
Свыше 10000	0,2	0,06

Выборку и отбор проб из серий фасованного «ангро» лекарственного растительного сырья цельного, измельчённого и порошка проводят, как указано для лекарственного растительного сырья, исключая выделение пробы для установления степени зараженности амбарными вредителями.

В случае обнаружения живых и мёртвых вредителей в фасованной продукции лекарственного растительного сырья и сборах проводят отбор дополнительной пробы массой 500 г для их определения.

2.8.20. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ТОКСИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ МЕТОДОМ АТОМНО-АБСОРБЦИОННОЙ СПЕКТРОСКОПИИ

Подготовка проб. Способ сухой минерализации – основан на полном разложении органических веществ путем сжигания пробы сырья в электропечи при контролируемом температурном режиме.

В кварцевый тигель берут навеску сырья массой 3 – 5 г (точная навеска). Тигель с навеской помещают в холодную муфельную печь и проводят обугливание, постепенно увеличивая температуру (на 50°С через каждые 30 минут) до 500 °С. Продолжают

минерализацию до получения серой золы. Тигель вынимают из печи, охлаждают до комнатной температуры и смачивают содержимое по каплям минимальным количеством раствора 15 г/л *азотной кислоты Р*. Выпаривают кислоту досуха на водяной бане с последующей выдержкой в сушильном шкафу при температуре до 140 °С. После охлаждения тигель с навеской снова помещают в печь, постепенно доводят температуру до 300 °С и выдерживают в течение 0,5 ч. Указанный цикл повторяют несколько раз. Минерализацию считают законченной, когда зола станет белого или слегка окрашенного цвета, без обугленных частиц. При наличии обугленных частиц повторяют обработку золы раствором азотной кислоты или водой.

Параллельно в двух тиглях проводят минерализацию добавляемых к навеске реактивов для контроля их чистоты.

Способ мокрой минерализации – основан на полном разрушении органических веществ пробы при нагревании с серной и азотной концентрированными кислотами с добавлением хлорной кислоты или перекиси водорода или при нагревании только с перекисью водорода.

Навеску сырья массой 3 – 5 г берут на беззольный фильтр, заворачивают в него и помещают на дно колбы Кьельдаля или плоскодонной колбы. В колбу вносят *кислоту азотную Р* из расчета 10 мл на 5 г навески и выдерживают не менее 15 мин. Можно оставить на ночь. Затем в колбу вносят 2 – 3 стеклянных шарика для равномерного кипения, закрывают грушевидной стеклянной пробкой и нагревают на электроплитке слабо, затем сильнее, упаривая содержимое колбы до объема 3 – 5 мл. Затем колбу охлаждают, вносят 10 мл *кислоты азотной Р*, содержимое упаривают до объема 5 мл, после чего охлаждают. Эту процедуру повторяют 2 – 4 раза. Затем в колбу вносят 10 мл *кислоты азотной Р*, 5 мл *кислоты серной Р*, 4 мл *кислоты хлорной Р* (или вместо *кислоты хлорной Р* 4 мл *концентрированного раствора пероксида водорода Р*) из расчета на 5 г сырья. Не допускается изменять последовательность внесения кислот, хлорная кислота всегда вносится последней. Содержимое колбы упаривают до объема около 5 мл, не допуская образования коричневой окраски жидкости. При появлении коричневой окраски нагревание прекращают.

Колбу охлаждают до комнатной температуры, добавляют 5 мл *кислоты азотной Р* и 2 мл *кислоты хлорной Р* (или вместо *кислоты хлорной Р* 2 мл *концентрированного раствора пероксида водорода Р*) и снова нагревают до появления белых паров серного ангидрида. Если при этом раствор не обесцветился, эту процедуру повторяют. Минерализацию считают законченной, если раствор после охлаждения остается бесцветным или бледно-желтым.

Для удаления остатков кислот в охлажденную колбу добавляют 10 мл *воды Р* и кипятят 10 мин с момента выделения белых паров, затем охлаждают. Добавление *воды Р* и нагревание повторяют еще 2 раза. Если при этом образуется осадок, в колбу вносят 20 мл *воды Р*, 2 мл *кислоты серной Р*, 5 мл *кислоты хлористоводородной Р* и кипятят до растворения осадка, постоянно дополняя испаряющуюся воду.

Параллельно проводят минерализацию добавляемых реактивов для контроля их чистоты.

Золу, полученную способом сухой минерализации, растворяют в тигле при нагревании в *кислоте азотной разведённой Р* из расчета 1 – 5 мл кислоты на навеску в зависимости от зольности сырья. Раствор выпаривают до влажных солей. Осадок растворяют в 15 – 20 мл раствора 15 г/л *азотной кислоты Р*, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят до метки той же кислотой.

При неполном растворении золы полученный раствор с осадком упаривают до влажных солей, перерастворяют в минимальном объеме смеси *воды Р* и *хлористоводородной кислоты Р* (1:1) по объему, еще раз упаривают до влажных солей и растворяют в 15 – 20 мл раствора 28 г/л *хлористоводородной кислоты Р*. Раствор количественно переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят до метки той же кислотой.

При неполном растворении золы полученный раствор с осадком доводят до объема 30 – 40 мл раствором 28 г/л *хлористоводородной кислотой Р* и подогревают на водяной бане или электроплитке при слабом нагреве в течение 0,5 ч. Если в этом случае полного растворения не наблюдается, раствор отфильтровывают через промытый растворителем

фильтр, осадок промывают и отбрасывают, а фильтрат переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят до метки той же кислотой.

При использовании способа мокрой минерализации полученный раствор минерализата упаривают до влажных солей и продолжают растворение по указанной схеме.

Определение токсических элементов проводят методом атомно-абсорбционной спектроскопии согласно *2.2.23*.

Подготовка проб для определения содержания мышьяка. В чашу с точной навеской сырья (3 – 5 г) добавляют 10 % от массы навески *магния оксида Р* и такое же количество раствора *магния нитрата Р* в *спирте Р* (в расчете на безводную соль). Полученную смесь тщательно перемешивают до образования однородной кашицы.

Допускается минерализация сырья без добавления смеси *магния оксида Р и магния нитрата Р*.

Чашу помещают на водяную баню или в сушильный шкаф при температуре 80 – 100 °С и выпаривают досуха, после чего переносят на электроплитку и обугливают при слабом нагреве до прекращения выделения дыма. Затем чашу помещают в электропечь, ранее отрегулированную на температуру 250 °С, повышают температуру до 450 °С постепенно на 50 °С в час и продолжают минерализовать в этих условиях до получения серой золы. Далее проводят минерализацию. Чашу вынимают из печи, охлаждают до комнатной температуры и смачивают содержимое по каплям минимальным количеством *воды Р*. Выпаривают воду досуха на водяной бане с последующей выдержкой в сушильном шкафу при температуре до 140 °С. После охлаждения чашу с навеской снова помещают в печь, постепенно доводят температуру до 300 °С и выдерживают в течение 0,5 ч. Указанный цикл повторяют несколько раз. Минерализацию считают законченной, когда зола станет белого или слегка окрашенного цвета, без обугленных частиц. При наличии обугленных частиц повторяют обработку золы *водой Р*.

Параллельно в двух чашках проводят минерализацию добавляемых к навеске реактивов для контроля их чистоты.

Далее определение содержания мышьяка проводят согласно *2.4.2*.

2.8.21. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ РАДИОНУКЛИДОВ

Требования настоящей статьи применяются в отношении лекарственного растительного сырья независимо от формы выпуска на этапах разработки и постановки на производство новых видов лекарственных средств при его переработке, производстве, хранении, транспортировке, закупке, ввозе в страну, сертификации и реализации (далее обращение лекарственного растительного сырья).

Государственному контролю на радиационную безопасность подлежит лекарственное растительное сырьё, выпускаемое предприятиями различных форм собственности на территории Республики Беларусь и ввозимое на территорию Республики Беларусь.

Термины и определения

В настоящей фармакопейной статье применяются следующие термины и определения:

Счётный образец – аналитическая проба – определённое количество пробы, выделенной методом квартования из объединённой пробы для измерений его радиационных параметров.

Радиоактивность – испускание ионизирующих излучений при самопроизвольном превращении радиоактивных ядер.

Активность радионуклида – отношение числа dN самопроизвольных превращений ядер данного радионуклида, происходящих за интервал времени dt, к этому интервалу.

$$A = \frac{dN}{dt}$$

Единица активности – Беккерель (Бк) – одно ядерное превращение в секунду.

Удельная активность радионуклида (Q) – отношение активности радионуклида в исследуемом образце к массе (объёму) исследуемой пробы (Бк/кг, Бк/л).

$$Q = \frac{A}{M}$$

Концентрирование удельной активности – процедура приготовления счётного образца путём высушивания, обугливания, озоления или химического концентрирования.

Средства измерения – включают в себя необходимые для определения удельной активности радионуклидов цезия-137:

- радиометрическая установка с приспособлениями для экспонирования счётных образцов;
- методики выполнения измерений на данной радиометрической установке;
- методики приготовления счётных образцов вместе с необходимыми устройствами, приспособлениями и инструментами.

Радиационный контроль – применение средств измерений для определения соответствия исследуемых образцов требованиям нормативов норм радиационной безопасности.

Общие положения

Настоящая фармакопейная статья рассматривает вопросы радиационного контроля лекарственного растительного сырья, полуфабрикатов, потребительских упаковок и сборов, применяемых в сфере обращения лекарственных средств.

При проведении радиационного контроля лекарственных средств в сфере обращения лекарственных средств, выполняются следующие стандартные процедуры:

- отбор проб из партии лекарственного растительного сырья или от серии лекарственных средств;
- приготовление счётных образцов, с концентрированием удельной активности в случае необходимости;
- измерение активности цезия-137 в счётных образцах;
- расчёт результатов измерений и погрешностей исследований;
- определение соответствия лекарственных средств критериям радиационной безопасности.

Отбор проб для радиационного контроля проводится согласно *2.8.19.* Подготовка счётных образцов лекарственных средств для определения удельной активности цезия-137 проводится на основании настоящей фармакопейной статьи.

Персонал, осуществляющий радиационный контроль лекарственных средств, должен пройти соответствующее обучение для работы на радиометрических установках, освоить методики выполнения измерений и методики приготовления счётных образцов.

Результатом измерений активности радионуклидов в счётном образце А является интервал значений активности от (А – ΔА) до (А + ΔА), в котором с вероятностью Р=0,95 находится значение измеряемой величины А (Бк).

$$A - \Delta A < A \leq A + \Delta A \qquad (1)$$

где:

А – значение измеренной активности радионуклида на данной радиометрической установке (Бк).

ΔА – значение погрешности при измерении А на данной радиометрической установке.

Пример. При измерении активности радионуклида получены следующие значения: А = 75 Бк; ДА = 20 Бк.

$$75 - 20 < 75 \leq 75 + 20 \rightarrow 55 < 75 \leq 95$$

с вероятностью Р = 0,95 значение измеряемой величины А (Бк) находится в интервале от 55 до 95 Бк.

Если часть интервала от (А – ΔА) до А, или {(А – ΔА) – А} находится в области отрицательных значений, то следует считать, что с вероятностью Р = 0,95 значение величины А находится в интервале:

От 0 до (A + ΔA) или {0 – (A + ΔA)} (2)

Пример. При измерении активности радионуклида получены следующие значения A = 15 Бк; ΔA = 20 Бк.

15 – 20 < 15 ≤ 15 + 20 (1) → 0 < 15 ≤ 35 (2)

с вероятностью P = 0,95 значение измеряемой величины A (Бк) находится в интервале от 0 Бк до 35 Бк.

Если значение активности A < 0, то следует считать, что значение величины A находится в интервале:

От 0 до ΔA или {0 – ΔA} (3)

Пример. При измерении активности радионуклида получены следующие значения A = -5 Бк; ΔA = 20 Бк.

Т.к. A < 0 -5 < ⇒ 0 – 20 (3)

с вероятностью P = 0,95 значение измеряемой величины A (Бк) находится в интервале от 0 Бк до 20 Бк

Результатом определения удельной активности радионуклидов в лекарственном растительном сырье Q (Бк/кг), является интервал, характеризуемых соотношением:

Q – ΔQ < Q ≤ Q + ΔQ

где:

Q – значение удельной активности радионуклида в исследуемом лекарственном растительном сырье;

ΔQ – значение погрешности.

Порядок отбора проб лекарственного растительного сырья.

Порядок отбора проб лекарственного растительного сырья включает выделение однородной по радиационному составу пробы для приготовления счётных образцов. Отбор проб должен при оптимальных затратах времени и средств обеспечить представительность лекарственных средств, находящихся на любом этапе обращения. Отбор проб осуществляется согласно *2.8.19.*

Примечание. Перед отбором точечных проб от выбранных транспортных единиц сырья, целесообразно выполнить дозиметрический контроль по мощности дозы гамма-излучения для определения безопасности партии сырья с помощью поисковых радиометров типа ДРГ-01Т, ДКС-96П, ДКС-96К, ДКС-96М, ДКС-96Б, СРП-88Н, МКС-04Н, ДКГ-02У. Определение однородности партии сырья возможно с помощью радиометрической установки, в этом случае анализируются точечные пробы из транспортных единиц сырья до составления объединённой пробы. Если в результате предварительного дозиметрического или радиационного контроля партии сырья установлена неоднородность партии или превышение допустимых показателей, то этот факт должен быть отмечен в акте отбора объединённой пробы. Решение о приёмке или об отказе от приёмки сырья может быть принято только после проведения полного анализа в соответствии с данными методическими указаниями.

Для измерения удельной активности цезия-137 в лекарственном растительном сырье и определения его соответствия критериям радиационной безопасности при оптимальных затратах времени и средств предлагается три варианта подготовки счётных образцов. В таблице 2.8.21.-1 приведены ориентировочные массы в зависимости от используемого варианта измерений.

Таблица 2.8.21.-1

№	Наименование	Массы навесок (не менее), г; определение Cs-137		
		1 вариант измерений	2 вариант измерений	3 вариант измерений

1	Корни алтея	40	280	400
2	Плоды аниса	40	400	600
3	Корневища аира	45	300	600
4	Почки берёзы	50	450	600
5	Цветки бессмертника	15	150	250
6	Плоды боярышника	50	350	600
7	Листья брусники	30	170	350
8	Побеги багульника	30	225	350
9	Корневища с корнями валерианы	40	300	450
10	Корневища и корни девясила	50	350	650
11	Трава донника	25	150	300
12	Кора дуба	50	300	500
13	Трака душицы	25	200	300
14	Трава зверобоя	30	170	350
15	Кора крушины	25	300	400
16	Столбики с рыльцами кукурузы	25	150	250
17	Цветки липы	30	200	450
18	Корни лопуха	40	350	500
19	Семена льна	60	600	800
20	Листья мать-и-мачехи	30	200	350
21	Трава мелиссы	25	180	250
22	Плоды можжевельника	50	400	600
23	Слоевища ламинарии	40	600	800
24	Листья мяты	25	180	250
25	Цветки ноготков	16	180	270
26	Листья ортосифона (почечный чай)	30	260	400
27	Цветки пижмы	25	220	350
28	Листья подорожника	35	280	400
29	Трава пустырника	20	180	300
30	Плоды расторопши	60	600	800
31	Корневища и корни родиолы	30	200	400
32	Плоды рябины	60	370	600
33	Листья сены	40	180	250
34	Трава спорыша	25	220	350
35	Корни солодки	30	270	400
36	Почки сосны	25	150	300
37	Плоды тмина	45	300	500
38	Листья толокнянки	35	200	450
39	Трава тысячелистника	15	200	300
40	Плоды укропа	40	330	500
41	Створки фасоли	20	180	280
42	Плоды фенхеля	40	380	500
43	Трава фиалки	25	200	300
44	Трава хвоща	25	130	280
45	Соплодия хмеля	20	190	300
46	Трава чабреца	30	170	300
47	Чага	25	350	400
48	Побеги черники	25	150	280
49	Трава череды	25	200	300
50	Трава чистотела	30	150	300
51	Листья шалфея	35	250	350
52	Плоды шиповника	50	400	600
53	Листья эвкалипта	30	240	400

54	Корневища и корни элеутерококка	40	400	600
55	Трава эрвы шерстистой	25	200	350

Таблица 2.8.21.–2

№	Наименование	Массы навесок (не менее), г; определение Cs-137		
		1 вариант измерений	2 вариант измерений	3 вариант измерений
1	Побеги	30	200	340
2	Почки	40	300	450
3	Цветки	25	200	300
4	Плоды	50	400	600
5	Листья	30	200	320
6	Трава	30	200	300
7	Кора	35	250	400
8	Семена	60	600	800
9	Корни	40	330	500
10	Корневища	40	360	600
11	Корневища с корнями	40	300	450

Определение цезия-137 при экспонировании счётного образца 1800 сек (30 мин).

1 вариант измерений – предполагает использование аттестованной геометрии – Denta 100 мл, измельчение указанной массы до фракции «крупный порошок», проходящей сквозь сито с отверстиями размером 2 мм (фракция из фильтр-пакетов может использоваться без дополнительного измельчения).

2 вариант измерений – предполагает использование аттестованной геометрии – сосуда Маринелли объёмом 1 л, сырьё фракции «измельчённое» (проходящее через сито 8 мм; сырьё, фасованное в пачку), допускается без измельчения анализировать цельное сырьё, фасованное в пачку, например, плоды боярышника, плоды шиповника, семена льна и ит.д., при достаточной насыпной массе.

3 вариант измерений – предполагает использование аттестованной геометрии – сосуда Маринелли объёмом 1 литр, измельчение указанной массы до фракции «крупный порошок», проходящей сквозь сито с отверстиями размером 2 мм.

Приготовление счётных образцов и измерение активности цезия-137 в пробах лекарственного растительного сырья.

Подготовка проб к измерениям. Подготовка проб к измерениям включает в себя отбор пробы, предварительное измельчение сырья с целью приготовления однородного счётного образца в соответствии с выбранным вариантом измерения, объёмом её заполнения и схемой анализа:

- пробу лекарственного растительного сырья предварительно измельчают с помощью ножа, секатора, мясорубки, тёрки, а затем в специальных лабораторных измельчителях, дробилках и мельницах, возможно использование кофемолки.
- в зависимости от выбранного варианта измерения, радиологическому исследованию подвергается лекарственное растительное сырьё со степенью измельчения 8 мм, 2 мм и 1 мм, т.е. частицы, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 7 мм, 2 мм и 1 мм.
- масса навески для радиологического исследования определяется для каждого вида сырья и выбора аттестованной геометрии и не может быть меньше указанной в таблице 2.8.21.–1.

Приготовление счётного образца для измерения цезия-137 зависит от поступившего на анализ сырья, используемого метода измерения и чувствительности используемой радиометрической установки. Сырьё, фасованное в пачку, как правило, измельчённое и проходит сквозь сито с отверстиями размером 8 мм. Сырьё, фасованное в фильтр-пакеты, как правило, «крупный порошок» и проходит сквозь сито с отверстиями размером 2 мм.

Брикет после разрушения представляет собой порошок, который, как правило, проходит сквозь сито с отверстиями размером 1 мм. Выбор аттестованных геометрий (сосуд Маринелли 1 л и Denta 100 мл) зависит от результатов, полученных в процессе анализа.

Приготовление счётного образца для определения удельной активности цезия-137. Пробу измельчают и просеивают сквозь сито с отверстиями 2 мм для аттестованной геометрии Denta 100 мл (1 вариант измерений), 7 мм (2 вариант измерений) или 2 мм (3 вариант измерений) для сосуда Маринелли. Измельчённое лекарственное растительное сырьё помещают в сосуд Ма.ринелли или Denta 100 мл, масса сырья не может быть меньше указанной в таблице 2.8.21.-1, и измеряют активность цезия-137.

Для определения массы измеряемого счётного образца сосуд взвешивают до и после его заполнения.

При получении отрицательного результата в Denta 100 мл (т.е. сырьё относится ко второй или третей группе радиационной безопасности) увеличивают массу счётного образца (2 вариант измерений) и повторно проводят измерение активности цезия-137 в сосуде Маринелли. При получении третей группы по критериям радиационной безопасности продолжают исследование по 3 варианту измерений. Схема проведения радиационного контроля приведена на рисунке 2.8.21.-1.

Измерение удельной активности цезия-137. Для измерения удельной активности цезия-137 рекомендуется использовать гамма-спектрометры со сцинтилляционными и полупроводниковыми детекторами, находящимися в свинцовой защите, толщина которой должна быть не менее 50 мм. Минимальная измеряемая активность подобных гамма-спектрометров 3-10 Бк.

Установленная настоящей статьёй масса анализируемой пробы в зависимости от выбранного варианта измерений обеспечивает приемлемую погрешность получаемого результата при измерении в стандартной геометрии – Denta 100 мл и сосуд Маринелли (1 л).

Первоначально измерение активности проводят в аттестованной геометрии – Denta 100 мл; как правило по первому варианту измерений чувствительности гамма-спектрометра не хватает для получения достоверного результата – увеличивают массу счётного образца и в качестве измерительного сосуда используют сосуд Маринелли (2 или 3 вариант измерений).

Измерение активности производится в соответствии с инструкцией к используемому гамма-спектрометру и настоящей статьёй. Рекомендуется использование компьютеризированных гамма-спектрометрических комплексов с программным обеспечением.

Обработка (вычисление) результатов измерения осуществляется в зависимости от типа использованного гамма-спектрометра.

Схема проведение радиационного контроля приведена на рисунке 2.8.21.-1.

В схеме под утвердительном ответом «Да» подразумевается соответствие полученного результата нормативу удельной активности цезия-137 в лекарственном растительном сырье. Ответ «Нет» - если сырье относится ко второй или третьей группе (по критериям радиационной безопасности).

Рисунок 2.8.21.-1

Счётный образец для определения цезия-137

↓

Измерение в аттестованной геометрии – Denta 100 мл (порошок 2 мм)
(1 вариант измерений)

Да → Лекарственное растительное сырьё соответствует нормативу удельной активности по цезию-137.

Нет → Лекарственное растительное сырьё не соответствует нормативу удельной активности по цезию-137. Необходимо продолжить анализ. Информирование поставщика, изготовителя или дистрибьютора оптовой сети.

↓

Измерение в аттестованной геометрии – сосуд Маринелли (фракция 8 мм)
(2 вариант измерений)

Да → Лекарственное растительное сырьё соответствует нормативу удельной активности по цезию-137.

Нет → Лекарственное растительное сырьё не соответствует нормативу удельной активности по цезию-137. Если Q_{Cs}<НУ, а ($Q_{Cs}+\Delta Q_{Cs}$)>НУ необходимо продолжить анализ.

↓

Измерение в аттестованной геометрии – сосуд Маринелли (фракция 2 мм)
(3 вариант измерений)

Да → Лекарственное растительное сырьё соответствует нормативу удельной активности по цезию-137.

Нет → Лекарственное растительное сырьё безусловно не соответствует нормативу удельной активности по цезию-137.

где: НУ – допустимый уровень норматива удельной активности по цезию-137.

2.9. ФАРМАЦЕВТИКО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ИСПЫТАНИЯ

2.9.1. РАСПАДАЕМОСТЬ ТАБЛЕТОК И КАПСУЛ

Испытание на распадаемость позволяет определить, распадаются ли таблетки или капсулы в пределах установленного времени, если они помещены в жидкую среду в экспериментальных условиях, указанных ниже.

Считают, что образцы распались, если:

a) нет остатка;

b) есть остаток, но он состоит из мягкой массы, не содержащей ощутимого ядра, которое не смачивается;

c) есть только фрагменты покрытия (таблетки) или только фрагменты оболочки на сетке, или, если были использованы диски, фрагменты оболочки, которые прилипли к нижней поверхности дисков (капсулы).

В случае, если длина таблеток и капсул не превышает 18 мм, используют прибор А, для таблеток и капсул большего размера используют прибор В.

ТЕСТ А – ТАБЛЕТКИ И КАПСУЛЫ НОРМАЛЬНОГО РАЗМЕРА

Прибор. Основная часть прибора (Рисунок 2.9.1.–1) представляет собой жесткую корзинку, которая поддерживает шесть цилиндрических прозрачных трубок длиной 77,5±2,5 мм, с внутренним диаметром 21,5 мм и с толщиной стенки около 2 мм. Каждая трубка имеет цилиндрический диск 20,7±0,15 мм в диаметре и толщиной 9,5±0,15 мм, изготовленный из прозрачного пластика с относительной плотностью от 1,18 до 1,20 или массой 3,0±0,2 г. В каждом диске просверлено 5 отверстий, в диаметре 2 мм, одно из них расположено в центре и остальные четыре - равномерно по кругу радиусом 6 мм от центра диска. На боковой поверхности диска имеются 4 равноудаленных друг от друга одинаковых углубления, вырезанных таким образом, что на верхней стороне они имеют ширину 9,5 мм и глубину 2,55 мм, а нижняя поверхность имеет форму квадрата со стороной 1,6 мм. Трубки удерживаются в вертикальном положении сверху и снизу двумя жесткими пластиковыми пластинами 90 мм в диаметре, толщиной 6 мм с шестью отверстиями. Отверстия равноудалены от центра и находятся на равном расстоянии друг от друга. К нижней поверхности нижней пластины прикреплена плетеная сетка с размером отверстий 2,00 мм, изготовленная из нержавеющей стальной проволоки диаметром 0,635 мм. Пластины жестко удерживаются на расстоянии 77,5 мм относительно друг друга вертикальными металлическими стержнями по окружности. Еще один металлический стержень прикреплен к центру верхней пластины, что позволяет прикрепить корзинку к механическому устройству, которое может поднимать и опускать ее плавно с постоянной частотой 29-32 цикла в минуту на расстояние от 50 мм до 60 мм.

Корзинку погружают в жидкость, указанную в общих или частных статьях, в подходящем сосуде, предпочтительно в химический стакан вместимостью 1 л. Объем жидкости должен быть таким, чтобы, когда корзинка находиться в крайнем верхнем положении, край проволочной сетки должен быть погружен не менее, чем на 15 мм ниже поверхности жидкости; когда же корзинка находится в самом нижнем положении, расстояние от сетки до дна химического стакана должно составлять не менее 25 мм, а верхние, открытые концы ранее упомянутых трубок должны находится над поверхностью жидкости. Температуру жидкости в приборе 35-39°C поддерживают при помощи подходящего устройства.

Конструкция корзинки может изменяться при условии соблюдения указанных выше требований для трубок и проволочной сетки.

Методика. В каждую из 6 трубок помещают одну таблетку или капсулу и, если указано, диск; погружают корзинку в сосуд с жидкостью, указанной в общей и частных статьях. Включают прибор, по истечении указанного времени отключают, вынимают корзинку и исследуют состояние таблеток или капсул. Лекарственное средство выдерживает испытание, если все таблетки или капсулы распались.

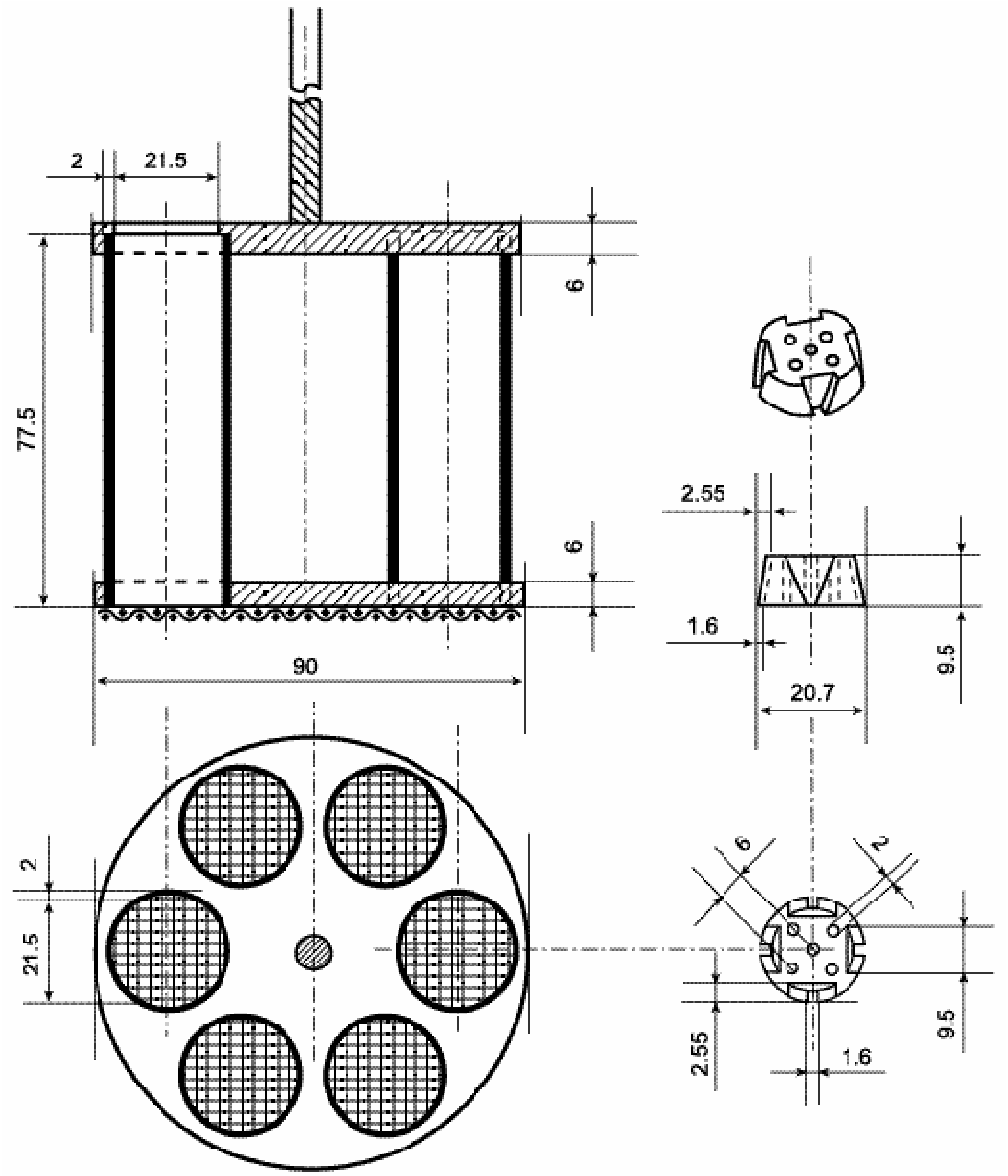


Рисунок 2.9.1.-1. - Прибор А
Размеры указаны в миллиметрах

ТЕСТ В–ТАБЛЕТКИ И КАПСУЛЫ БОЛЬШИХ РАЗМЕРОВ

Прибор. Основная часть прибора (Рисунок 2.9.1.–21) представляет собой жесткую корзинку, которая поддерживает три цилиндрические стеклянные трубки длиной 77,5±2,5 мм, с внутренним диаметром 33,0 ±0,5 мм и с толщиной стенки

2,5±0,5 мм. Каждая трубка имеет цилиндрический диск 31,4±0,13 мм в диаметре и толщиной 15,3±0,15 мм, изготовленный из прозрачного пластика с относительной плотностью от 1,18 до 1,20 или массой 13,0±0,2 г. В каждом диске просверлено 7 отверстий диаметром 3,15±0,1 мм, одно из них расположено в центре и остальные шесть - равномерно по кругу радиусом 4,2±0,1 мм от центра диска. Трубки удерживаются в вертикальном положении сверху и снизу двумя жесткими пластиковыми пластинами 97 мм в диаметре, толщиной 9 мм с тремя отверстиями. Отверстия равноудалены от центра и находятся на равном расстоянии друг от друга. К нижней поверхности нижней пластины прикреплена плетеная сетка с отверстиями размером 2,0±0,2 мм, изготовленная из нержавеющей стальной проволоки диаметром 0,63±0,03 мм. Пластины удерживаются жестко на расстоянии 77,5 мм относительно друг друга вертикальными металлическими стержнями по окружности. Еще один металлический стержень прикреплен к центру верхней пластины, что позволяет прикрепить корзинку к механическому устройству, которое может поднимать и опускать ее плавно с постоянной частотой 29-32 цикла в минуту на расстояние от 55±2 мм.

Корзинку погружают в жидкость, указанную в общих или частных статьях, в подходящем сосуде, предпочтительно в химический стакан вместимостью 1 л. Объем жидкости должен быть таким, чтобы, когда корзинка находится в крайнем верхнем положении, край проволочной сетки должен быть погружен не менее, чем на 15 мм ниже поверхности жидкости; когда же корзинка находится в самом нижнем положении, расстояние от сетки до дна химического стакана должно составлять не менее 25 мм, а верхние, открытые концы ранее упомянутых трубок должны находиться над поверхностью жидкости. Температуру жидкости в приборе 35-39°C поддерживают при помощи соответствующего устройства.

Конструкция корзинки может изменяться при условии соблюдения указанных выше требований для трубок и проволочной сетки.

Методика. Испытывают 6 таблеток или капсул, используя либо две корзинки параллельно, либо выполняя испытание дважды. В каждую из 3 трубок помещают одну таблетку или капсулу и, если указано, диск; погружают корзину в сосуд с жидкостью, указанную в общих или частных статьях. Включают прибор, по истечении указанного времени отключают, вынимают корзинку и исследуют состояние таблеток или капсул. Лекарственное средство выдерживает испытание, если 6 таблеток или капсул распались.

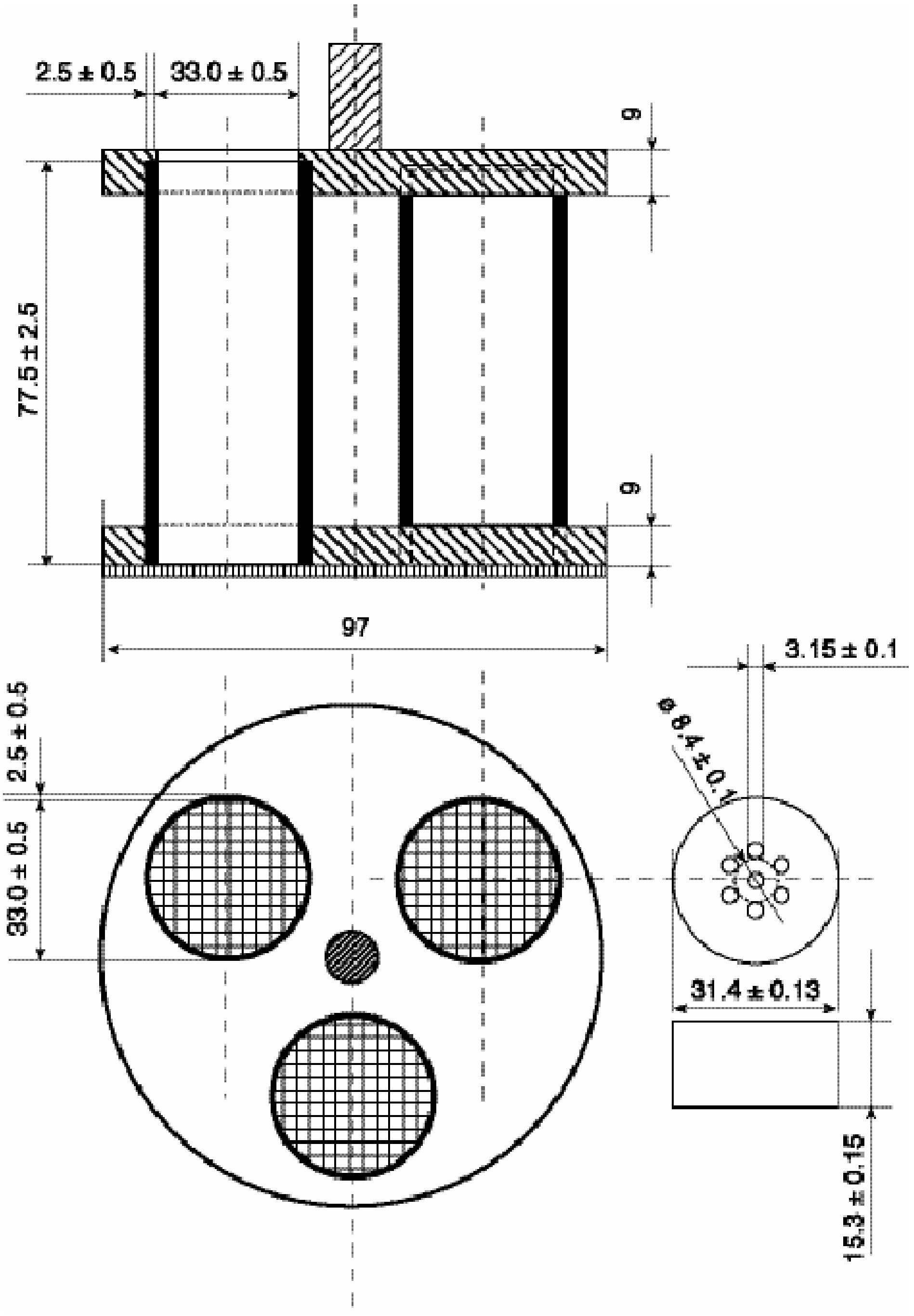


Рисунок 2.9.1.-2. - Прибор B
Размеры указаны в миллиметрах.

2.9.2. РАСПАДАЕМОСТЬ СУППОЗИТОРИЕВ И ПЕССАРИЕВ

Испытание на распадаемость позволяет определить, размягчаются или распадаются ректальные или вагинальные суппозитории или пессарии или вагинальные таблетки в пределах установленного времени, если они помещены в жидкую среду в экспериментальных условиях, указанных ниже.

Считают, что образцы распались, если:

a) наблюдается полное растворение;

b) компоненты суппозитория или пессария разделились: расплавленные жировые вещества собрались на поверхности жидкости, нерастворимые вещества осели на дно и растворимые компоненты растворились; в зависимости от состава

и способа приготовления компоненты лекарственного средства могут быть распределены по одному или нескольким из вышеуказанных путей;

c) размягчение образца сопровождается заметным изменением формы, без полного разделения компонентов; размягчением считается также отсутствие у суппозитория или пессария твердого ядра, оказывающего сопротивление давлению стеклянной палочки;

d) наблюдается разрыв желатиновой оболочки ректальной или вагинальной капсулы, позволяющий высвобождаться ее содержимому;

e) на перфорированном диске не осталось осадка или осадок, который остался, состоит из мягкой или пенообразной массы, не имеющей твердого ядра, оказывающего сопротивление давлению стеклянной палочки (вагинальные таблетки).

Прибор. Прибор (Рисунок 2.9.2.-1) состоит из прозрачного стеклянного или пластмассового полого цилиндра с соответствующей толщиной стенок, внутри которого с помощью трех держателей закреплено металлическое устройство. Устройство представляет собой два перфорированных диска из нержавеющего металла, закрепленных на расстоянии около 30 мм друг от друга. Диаметр дисков почти равен внутреннему диаметру цилиндра, и в каждом диске имеется 39 отверстий диаметром 4 мм. Испытания проводят, используя три таких прибора, каждый из которых содержит отдельный образец. Каждый прибор помещают в сосуд с термостатирующим устройством, вместимостью не менее 4 л, заполненный водой с температурой от 36^{0}C до 37^{0}C, если нет других указаний в частной статье. Приборы могут быть также помещены вместе в один сосуд вместимостью не менее 12 л. Сосуд снабжен медленно движущейся мешалкой и устройством, которое поддерживает прибор в вертикальном положении не менее чем на 90 мм ниже поверхности воды и дает возможность переворачивать его на 180^{0}C, не вынимая из воды.

Методика. Испытывают три суппозитория или пессария. Каждый образец помещают на нижний диск устройства, устанавливают устройство в цилиндр прибора и закрепляют его. Помещают прибор в сосуд с водой и начинают испытание. Приборы переворачивают каждые 10 мин. По истечении времени, указанного в частной статье, исследуют образцы. Лекарственное средство выдерживает испытание, если все образы распались.

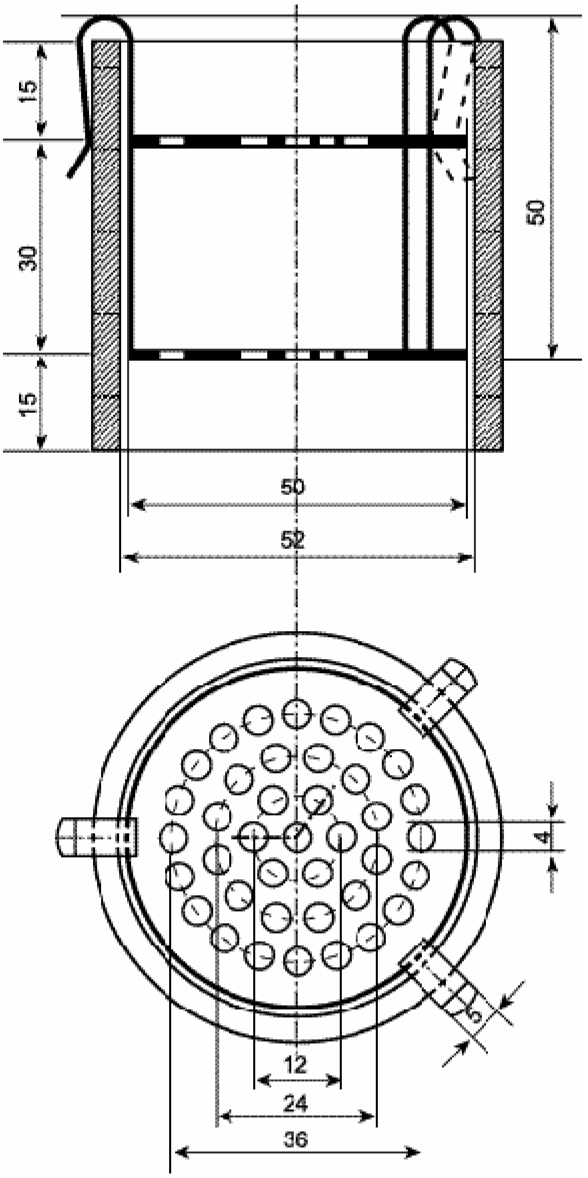
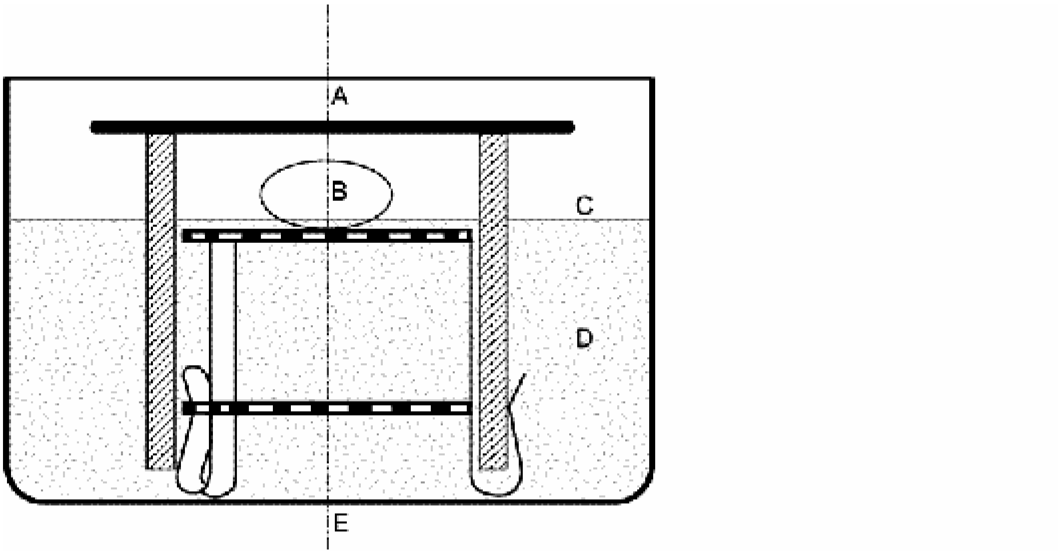


Рисунок 2.9.2.-1. – Прибор для определения распадаемости суппозиториев и пессариев
Размеры указаны в миллиметрах

МЕТОД ИСПЫТАНИЯ ВАГИНАЛЬНЫХ ТАБЛЕТОК

Применяют описанный выше прибор, установленный на держателях (см. Рисунок 2.9.2.-2). Прибор помещают в химический стакан подходящего диаметра, который содержит воду с температурой от 36^{0}С до 37^{0}С. Поверхность воды должна быть немного ниже верхнего перфорированного диска. Затем с помощью пипетки прибавляют воду с температурой от 36^{0}С до 37^{0}С до тех пор, чтобы перфорацию диска покрывала лишь однородная пленка воды. Испытывают три вагинальных таблетки. Каждую в отдельности помещают на верхний диск устройства, накрывают прибор стеклянной пластинкой, чтобы поддерживать соответствующие условия влажности. По истечении времени, указанного в частной статье, исследуют образцы. Лекарственное средство выдерживает испытание, если все образцы распались.



А – стеклянная пластина
В – вагинальная таблетка
С – поверхность воды
D - вода
Е - стакан

Рисунок 2.9.2.-2.

2.9.3. ТЕСТ «РАСТВОРЕНИЕ» ДЛЯ ТВЕРДЫХ ДОЗИРОВАННЫХ ФОРМ

Под степенью растворения твердой дозированной формы понимают количество действующего вещества, в процентах, от содержания, указанного в разделе «Состав», которое в условиях, описанных в частной статье, должно перейти в раствор.

Данное испытание используют для определения степени растворения действующих веществ твердых дозированных форм (например, таблетки, капсулы и суппозитории).

Если нет других указаний в частной статье, проведение теста «Растворение» не является обязательным для жевательных таблеток, поливитаминных лекарственных средств и в других случаях, для которых обоснована неинформативность данного теста.

Для проведения испытания может использоваться прибор с лопастью-мешалкой, корзинкой или, в специальных случаях, с проточной кюветой, если нет других указаний в частной статье. # Проточный прибор обычно целесообразно применять в том случае, когда действующее вещество испытуемого лекарственного средства плохо растворимо в воде и водных средах растворения. В каждом конкретном случае применения теста «Растворение» должно быть указано следующее:

- используемый прибор; в тех случаях, когда применяется прибор с проточной кюветой, должен быть указан тип проточной кюветы (Рисунок 2.9.3.-4/5/6);
- состав, объем и температура среды растворения;
- скорость вращения или скорость протекания среды растворения;
- время, методика и объем отбираемого испытуемого раствора или условия для непрерывного контроля;
- методика анализа;
- количество или количества действующих веществ, которые должны раствориться за указанное время.

ПРИБОР

Выбор используемого прибора зависит от физико-химических характеристик дозированной формы. Все части прибора, которые могут вступать в контакт с лекарственным средством или средой растворения, должны быть химически инертны, не адсорбировать, не реагировать или каким-либо другим способом искажать результаты испытания. Все металлические части прибора, которые могут вступать в контакт с лекарственным средством или средой растворения, должны быть изготовлены из нержавеющей стали или покрыты соответствующим материалом для того, чтобы эти части не взаимодействовали или каким-либо другим способом не искажали результаты испытания. Прибор должен быть сконструирован таким образом, чтобы свести к минимуму любые колебания и вибрацию, обусловленную проточной системой или элементом, который плавно вращается.

Желательно использовать прибор, который позволяет наблюдать за испытуемым лекарственным средством и мешалкой во время проведения теста «Растворение».

Прибор с лопастью-мешалкой. Прибор (см. Рисунок 2.9.3.-1) состоит из:

- цилиндрического сосуда из боросиликатного стекла или другого подходящего прозрачного материала с полусферическим дном и номинальным объемом 1000 мл; крышки, замедляющей испарение; в крышке должно быть центральное отверстие для оси мешалки и другие отверстия для термометра и устройств, используемых для отбора жидкости;
- мешалки, состоящей из вертикального вала, к концу которого прикреплена лопасть, имеющая форму части круга, отрезанного двумя параллельными хордами; лопасть должна проходить через диаметр вала таким образом, чтобы нижняя часть лопасти находилась на одном уровне с нижней частью вала; вал должен располагаться таким образом, чтобы его ось находилась на расстоянии не более 2 мм от оси сосуда, а нижняя часть лопасти была на высоте (25±2) мм от внутренней поверхности дна сосуда. Верхняя часть вала должна присоединяться к мотору, снабженному регулятором скорости; мешалка должна вращаться плавно, без заметного качания;
- водяной бани, которая поддерживает постоянную температуру среды растворения 37,0±0,5^{0}С.

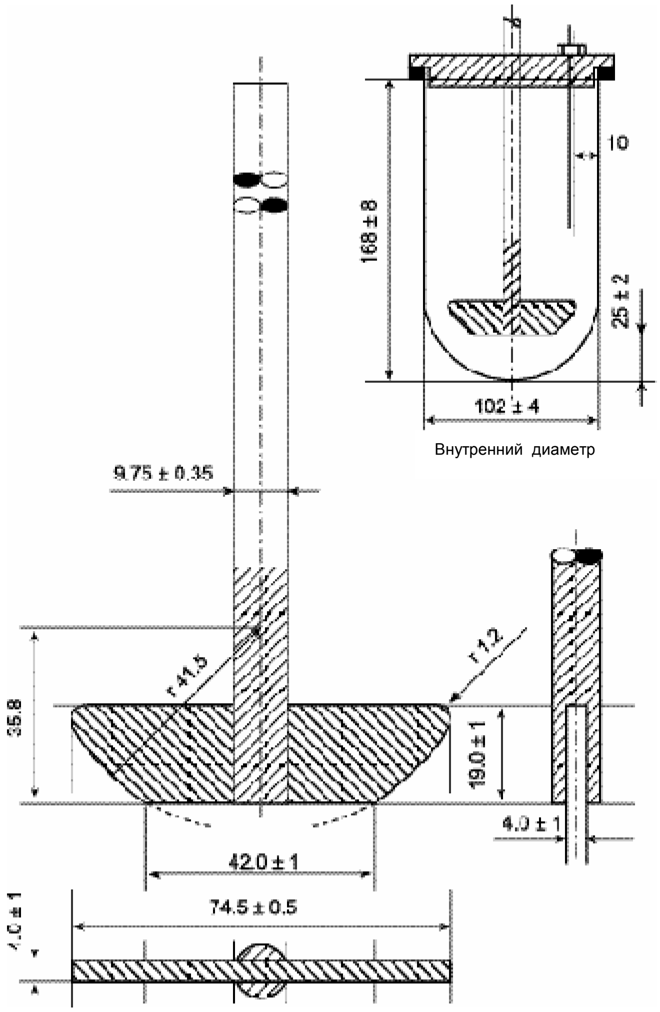


Рисунок 2.9.3.-1. – Прибор с лопастью-мешалкой
Размеры указаны в миллиметрах

Прибор с корзинкой. Прибор (см. Рисунок 2.9.3.-2) состоит из:

- сосуда, идентичного описанному выше сосуду для прибора с лопастью-мешалкой;
- мешалки, состоящей из вертикального вала, к нижней части которого прикреплена цилиндрическая корзинка, которая состоит из двух частей: верхняя часть, имеющая отверстие диаметром 2 мм, должна быть приварена к валу и снабжена тремя упругими зажимами или другим подходящим приспособлением, позволяющим удалять нижнюю часть корзинки для введения испытуемого лекарственного средства и прочно удерживать нижнюю часть концентрически с осью сосуда во время вращения; нижняя часть корзинки представляет собой сваренную в виде цилиндра оболочку с узким ободком листового металла вверху и внизу; если нет других указаний в частной статье, сетка состоит из проволоки диаметром 0,254 мм, образующая квадратные отверстия площадью 0,381 мм^2; корзинка с золотым покрытием толщиной 2,5 мкм может использоваться для проведения испытаний в разведенной кислотной среде; дно корзинки должно находиться на высоте 25±2 мм от внутренней поверхности дна сосуда; верхняя часть вала должна подсоединяться к мотору, снабженному регулятором скорости; мешалка должна вращаться плавно, без заметных качаний;
- водяной бани, которая поддерживает постоянную температуру среды растворения 37,0±0,5^{0}С.

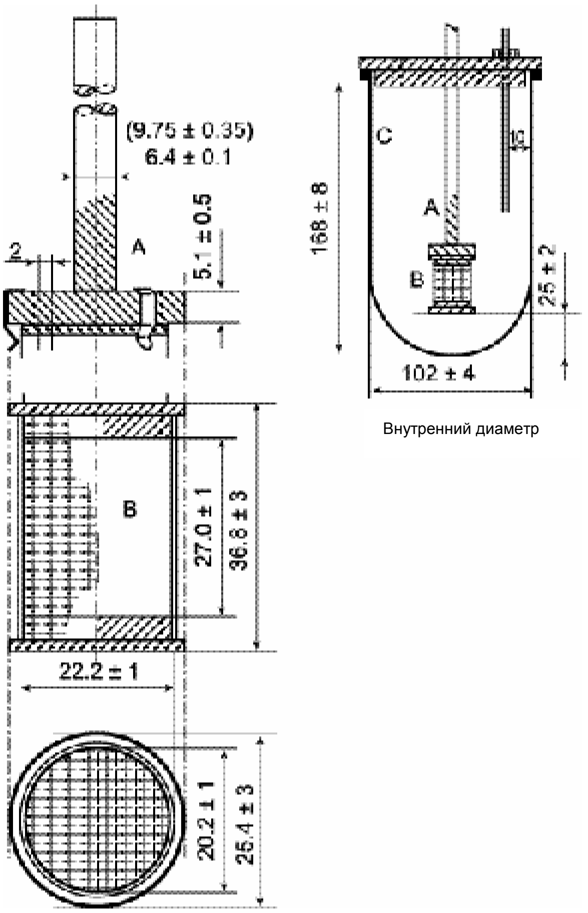


Рисунок 2.9.3.-2 – Прибор с корзинкой
Размеры указаны в миллиметрах

Проточный прибор. Прибор (см. Рисунок 2.9.3.-3) состоит из:

- резервуара для среды растворения;
- насоса, который прокачивает среду растворения вверх через проточную кювету;
- проточной кюветы (см. Рисунок 2.9.3.-4/5/6) из прозрачного материала, установленную вертикально, с фильтрующей системой, предотвращающей потерю нерастворившихся частиц.

Проточная кювета, представленная на Рисунке 2.9.3.-6, специально предназначена для липофильных твердых дозированных форм, таких как суппозитории и мягкие капсулы. Она состоит из трех прозрачных частей, которые вставляются друг в друга. Нижняя часть (1) сделана из двух сообщающихся камер, присоединенных к устройству переполнения.

Среда растворения проходит через камеру А и поднимается вверх. Движение потока в камере В направлено вниз, потом к маленькой капиллярной трубке, которая ведет вверх к фильтрующему устройству. Средняя часть (2) кюветы имеет полость, предназначенную для сбора липофильных вспомогательных веществ, которые всплывают в среде растворения. Металлическая решетка служит в качестве грубого фильтра. В верхней части (3) имеется место, куда помещается фильтр из бумаги, стекловолокна или целлюлозы;

- водяной бани, которая поддерживает постоянную температуру среды растворения 37±0,5^{0}С.

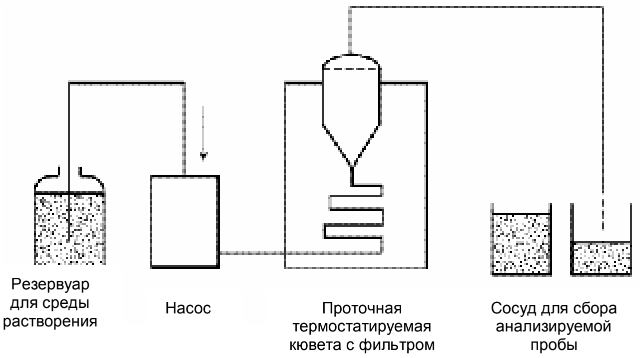


Рисунок 2.9.3.-3. – Проточный прибор

Среда растворения. # В качестве среды растворения могут использоваться *вода Р, 0,1 М раствор кислоты хлористоводородной,* фосфатные буферные растворы с рН от 6,8 до 7,6 и другие водные растворители. # Неводные растворители в средах растворения используют в исключительных случаях, и их применение требует дополнительного обоснования.

Если средой растворения является буферный раствор, его рН устанавливается с точностью до ±0,05 от указанного значения.

Перед проведением испытания из среды растворения удаляются растворенные газы, (# например, фильтрованием под вакуумом, обработкой ультразвуком, кипячением либо любым другим методом), поскольку они могут вызвать образование пузырьков, которые существенно влияют на результаты испытаний.

Обычный объем среды растворения – 900-1000 мл, температура среды растворения – 37,0±0,5^{0}С.

МЕТОДИКА

Приборы с лопастью-мешалкой и корзинкой

Помещают указанный в частной статье объем среды растворения в сосуд, собирают прибор, нагревают среду растворения до 37±0,5^{0}С и удаляют термометр.

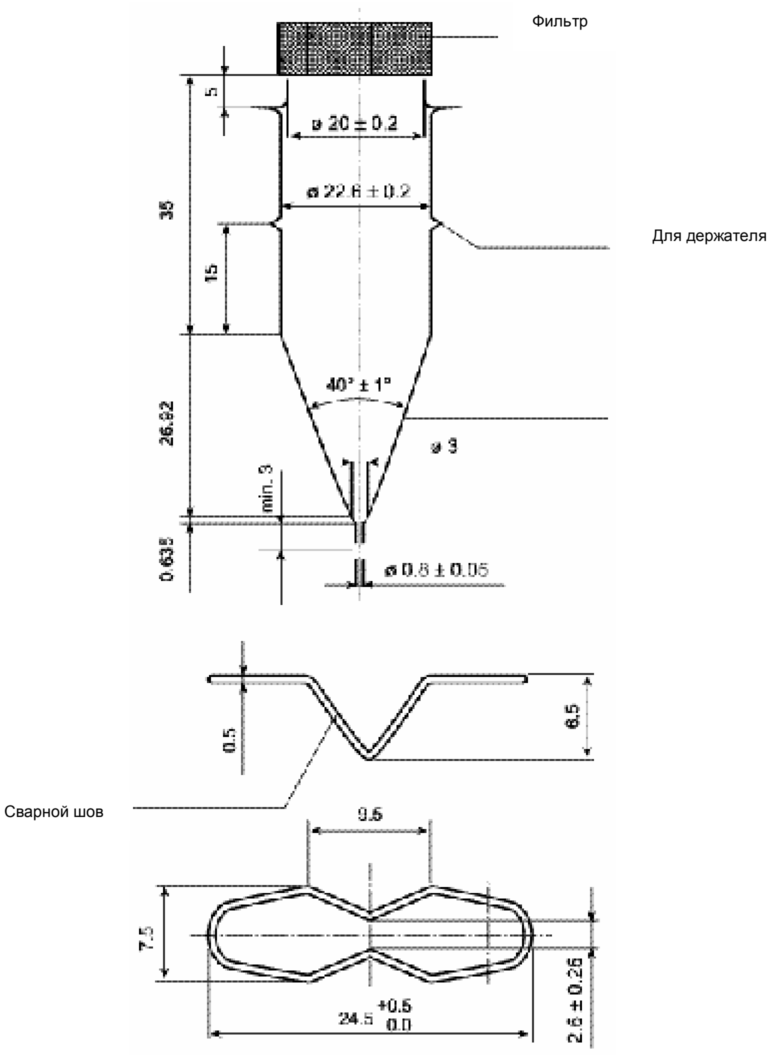
Помещают одну единицу испытуемого лекарственного средства в прибор. # Возможно помещение несколько единиц испытуемого лекарственного средства одновременно. Для прибора с лопастью-мешалкой: перед началом вращения лопасти лекарственное средство помещают на дно сосуда; твердые дозированные формы, которые при этом могут всплывать, помещают на дно сосуда горизонтально с помощью соответствующего устройства, например, проволоки или стеклянной спирали.

Для прибора с корзинкой: лекарственное средство помещают в сухую корзинку, которую опускают в соответствующее положение перед началом вращения.

Следует принять меры, обеспечивающие отсутствие пузырьков воздуха на поверхности лекарственного средства. Вращение лопасти-мешалки или корзинки с указанной скоростью (±4 %) начинают немедленно. # Скорость вращения обычно составляет 50 об/мин для лопасти в случае использования прибора с лопастью-мешалкой и 100 об/мин – для корзинки.

Проточный прибор

- Кюветы (см. Рисунок 2.9.3.-4/5)



Держатель для 22,6 мм кюветы

Рисунок 2.9.3.-4. – Проточная кювета
Размеры указаны в миллиметрах

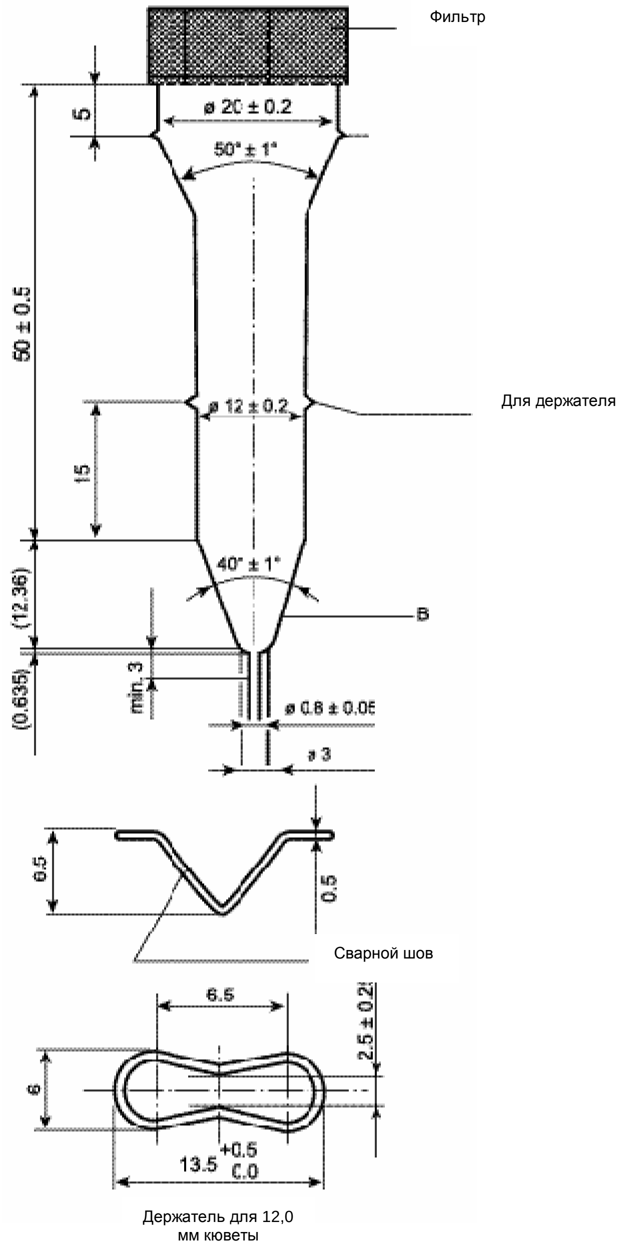


Рисунок 2.9.3.-5. – Проточная кювета
Размеры указаны в миллиметрах

Чтобы предохранить вход в камеру, предназначенный для жидкости, на дно конуса помещают один шарик диаметром 5±0,5 мм, затем – стеклянные шарики подходящего размера, предпочтительнее диаметром 1±0,1 мм. Посредством специального держателя помещают одну единицу испытуемого лекарственного средства в кювету на/или внутрь полученного слоя стеклянных шариков. Собирают фильтрующую головку.

Нагревают среду растворения до температуры 37±0,5^{0}C. Используя насос, пропускают с указанной скоростью (±5 %) среду растворения через дно кюветы для получения подходящего непрерывного потока в открытом или закрытом цикле.

- Кюветы (Рисунок 2.9.3.-6)

Помещают одну единицу испытуемого лекарственного средства в камеру А. # Возможно помещение несколько единиц испытуемого лекарственного средства одновременно. Закрывают кювету подготовленным фильтрующим устройством. В

начале испытания в камере А удаляют воздух через маленькое отверстие, соединенное с фильтрующим устройством. Нагревают среду растворения до соответствующей температуры, учитывая температуру плавления лекарственного средства. Используя подходящий насос, пропускают с указанной скоростью (±5%) нагретую среду растворения через дно кюветы, получая непрерывный поток в открытом или закрытом цикле. Камера В заполняется средой растворения, когда среда растворения начнет переливаться через край, воздух начнет выходить через капилляр. Лекарственное средство распределяется в среде растворения в соответствии со своими физико-химическими свойствами. В обоснованных и разрешенных случаях испытанию могут подвергаться представительные части суппозиториев большого размера.

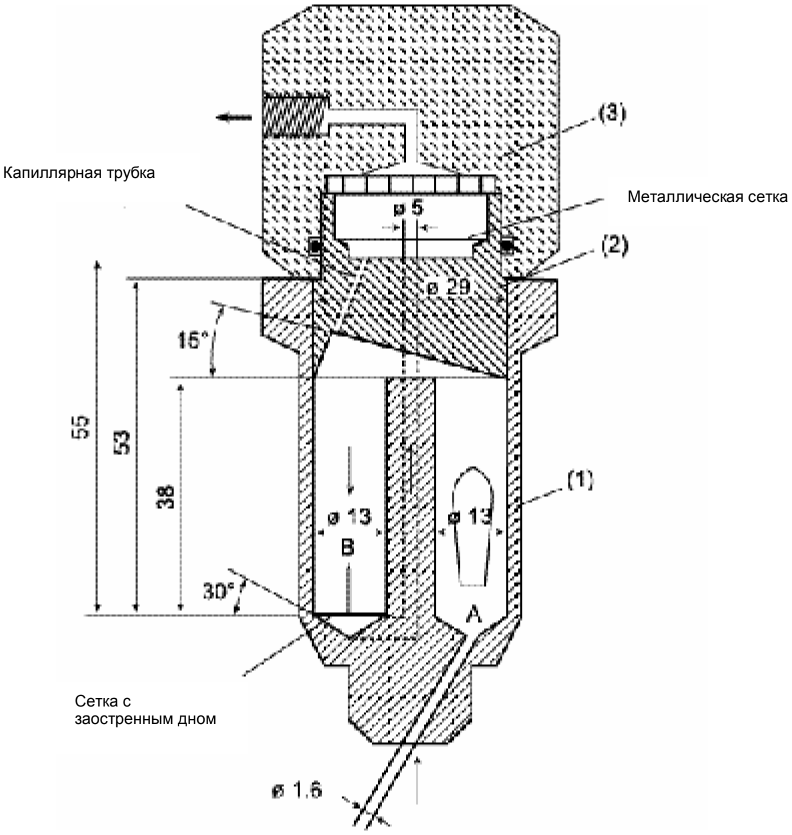


Рисунок 2.9.3.-6. – Проточная кювета
Размеры указаны в миллиметрах

ОТБОР ПРОБ И ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ

При использовании прибора с лопастью-мешалкой или корзинкой отбор проб указанного объема или объемов проводят в указанное время или через указанные интервалы, или непрерывно из участка посередине между поверхностью среды растворения и верхней частью корзинки или лопасти-мешалки на расстоянии не менее 1 см от стенки сосуда.

При использовании прибора с проточной кюветой отбор проб всегда проводят у выходного отверстия кюветы, независимо от того, открыта цепь или закрыта.

Необходимо компенсировать отобранный объем жидкости прибавлением равного объема среды растворения или соответствующими изменениями в расчетах, исключая те случаи, когда используются непрерывные измерения при проведении испытаний с лопастью-мешалкой или корзинкой (отобранная жидкость при этом возвращается обратно в сосуд), или когда отбирается только одна порция жидкости.

Отобранную жидкость фильтруют, используя инертный фильтр с соответствующим размером пор, который не вызывает значительной адсорбции действующего вещества из раствора и не содержит таких веществ, которые экстрагируются средой растворения и не влияют на результаты указанного аналитического метода. Анализ фильтрата проводят методом, указанным в частной статье.

Количество действующего вещества, растворившегося в течение указанного времени, выражается в процентах от содержания, указанного в разделе «Состав».

Если нет других указаний в частных статьях, для каждой единицы испытуемого лекарственного средства за 45 мин в раствор должно перейти не менее 75 % и не более 115 % действующего вещества от его содержания, указанного в разделе «Состав». Если одна из единиц испытуемого лекарственного средства не соответствует этому требованию, проводят испытание еще шести единиц испытуемого лекарственного средства.

В случае использования в тесте «Растворение» совокупности единиц испытуемого лекарственного средства, которая рассматривается как одна единица испытуемого лекарственного средства, проводят параллельно испытание для шести таких единиц. Полученные результаты пересчитывают на одну единицу дозированного лекарственного средства. Если нет других указаний в частных статьях, для каждой единицы испытуемого лекарственного средства за 45 мин в раствор должно перейти не менее 75 % и не более 115 % действующего вещества от его содержания, указанного в разделе «Состав». Дополнительные испытания в данном случае не проводят.

2.9.4. ТЕСТ «РАСТВОРЕНИЕ» ДЛЯ ТРАНСДЕРМАЛЬНЫХ ПЛАСТЫРЕЙ

Данный тест используется для определения степени растворения действующих веществ трансдермальных пластырей.

1. МЕТОД СБОРНОГО ДИСКА

Оборудование. Используют мешалку и конструкцию сосуда прибора с лопастью-мешалкой, описанного в тесте «Растворение» твердых дозированных форм *(2.9.3)* с добавлением сборного стального диска из нержавеющей стали (ССД - Сборный Стальной Диск) в виде сетки с размером отверстий 125 мкм (см. Рисунок 2.9.4.-1).

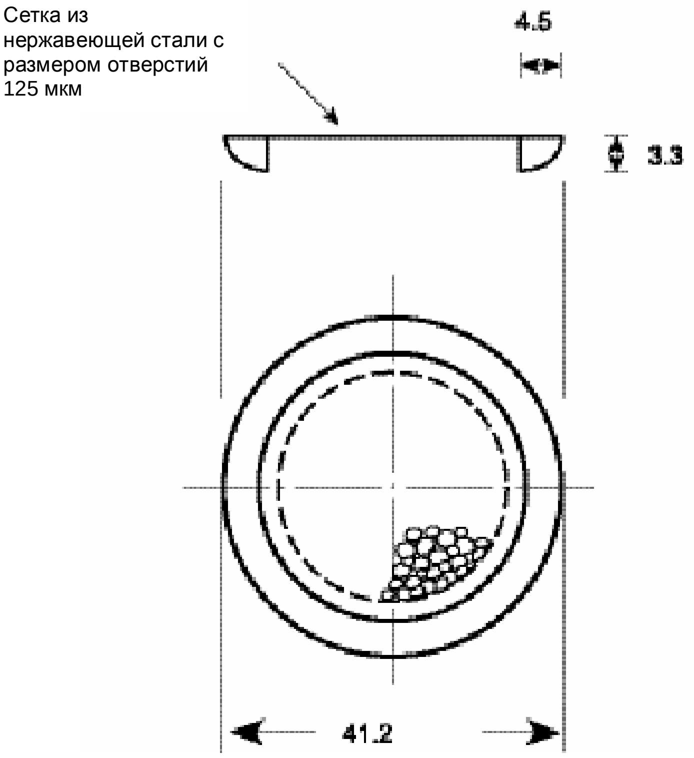


Рисунок 2.9.4.-1. – Сборный диск
Размеры указаны в миллиметрах

ССД крепится на дне сосуда таким образом, чтобы свести к минимуму мертвую зону между ССД и дном сосуда. На ССД крепится пластырь поверхностью высвобождения кверху и параллельно лопасти мешалки. Во время испытания расстояние между лопастью-мешалкой и поверхностью пластыря в ССД должно составлять 25±2 мм (см. Рисунок 2.9.4.-2). Испытание выполняют при температуре 32±0,5°С. Во время испытания сосуд следует закрывать, чтобы избежать испарения.

Процедура. Помещают указанный в частной статье объем среды растворения в сосуд и доводят температуру до 32±0,5^{0}С. Пластырь помещают на ССД, убедившись в том, чтобы поверхность высвобождения пластыря максимально распластана на диске. Пластырь может крепиться к ССД с помощью клея или двусторонней клейкой ленты. Предварительно следует проверить, не влияют ли клей или лента на результаты испытания и не адсорбируются ли на них действующие вещества. Прижимают пластырь, при этом он не должен выходить за пределы ССД. Для этого, а также для того, чтобы убедиться в однородности лекарственного средства и равномерности его распределения на поверхности, можно отрезать часть пластыря, которую точно взвешивают, для определения растворения. Это не относится к пластырям мембранного типа. Пластырь, прикрепленный к ССД, помещают на дно сосуда поверхностью высвобождения пластыря вверх. Быстро вращают мешалку, например, со скоростью 100 об/мин. Через определенные промежутки времени отбирают пробу из участка между поверхностью среды растворения и верхушкой лопасти мешалки, не менее, чем в 1 см от стенки сосуда.

Анализируют пробу, при необходимости учитывают поправку на изменение объема. Повторяют испытание с несколькими пластырями.

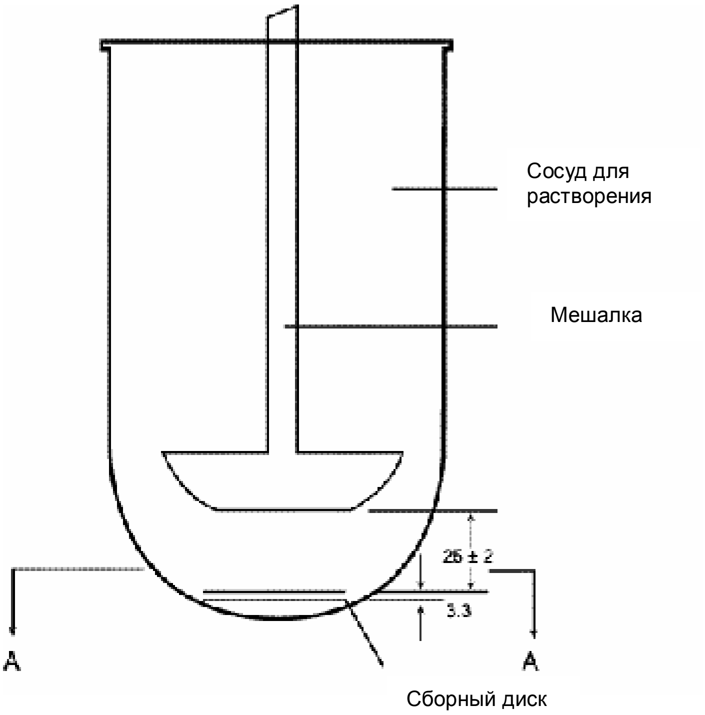


Рисунок 2.9.4.-2. – Мешалка и диск.
Размеры указаны в миллиметрах

2. МЕТОД ЯЧЕЙКИ

Оборудование. Используют мешалку и конструкцию сосуда прибора с лопастью-мешалкой, описанного в тесте «Растворение» для твердых дозированных форм *(2.9.3)* с добавлением экстракционной ячейки (*ячейка*).

Ячейка выполнена из химически инертного материала и состоит из *основания*, *крышки* и, при необходимости, из *мембраны*, которая помещается на пластырь для его изоляции от среды, которая может повлиять на физико-химические свойства пластыря (см. Рисунок 2.9.4.-3).

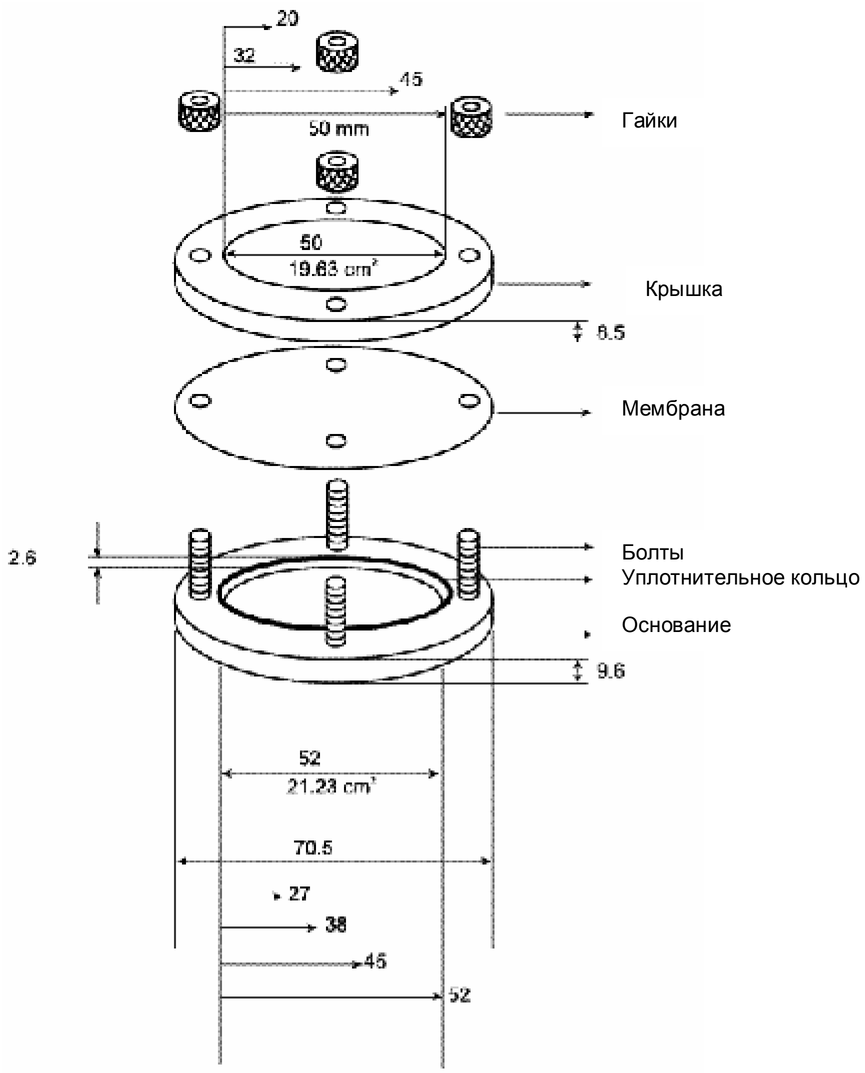


Рисунок 2.9.4.-3. – Экстракционная ячейка
Размеры указаны в миллиметрах

Основание. Центральная часть основания имеет полость, в которую помещается пластырь. Глубина полости – 2,6 мм, диаметр должен соответствовать размеру испытуемого пластыря. Можно использовать следующие диаметры: 27 мм, 38 мм, 45 мм, 52 мм, что соответствует объемам 1,48 мл, 2,94 мл, 4,13 мл, 5,52 мл.

Крышка. Крышка имеет отверстие в центре, диаметр которого соответствует размеру испытуемого пластыря. Таким образом, пластырь будет располагаться точно в центре, а поверхность высвобождения будет ограничена. Используются следующие диаметры: 20 мм, 32 мм, 40 мм, 50 мм, что соответствует объемам 3,14 мл, 8,03 мл, 12,56 мл, 19,63 мл. Крышка удерживается с помощью гаек, вкрученных в болты, вставленные в основание. Между крышкой и основанием помещается уплотнительное кольцо, которое одевается прямо на сосуд.

Экстракционная ячейка. *Ячейка* позволяет удерживать пластырь поверхностью высвобождения кверху в горизонтальном положении, параллельно лопасти мешалки. Расстояние между лопастью и поверхностью пластыря должно составлять 25±2 мм (см. Рисунок 2.9.4.-4). Испытание выполняют при температуре

32±0,5°С. Во время испытания сосуд следует закрывать, чтобы избежать испарения.

Методика. Помещают указанный в частной статье объем среды растворения в сосуд и доводят температуру до 32±0,5°С. Пластырь помещают поверхностью высвобождения вверх точно по центру ячейки. Закрывают ячейку, если необходимо используют гидрофобное вещество (например, *вазелин Р*) для смазывания плоских поверхностей для более плотного соединения. Помещают ячейку на дно резервуара. Быстро вращают мешалку, например, со скоростью 100 об/мин. Через определенные промежутки времени отбирают пробу из участка между поверхностью среды растворения и вершиной лопасти мешалки не менее чем в 1 см от стенки резервуара.

Анализируют пробу, при необходимости дают поправку на изменение объема. Испытание повторяют с несколькими пластырями.

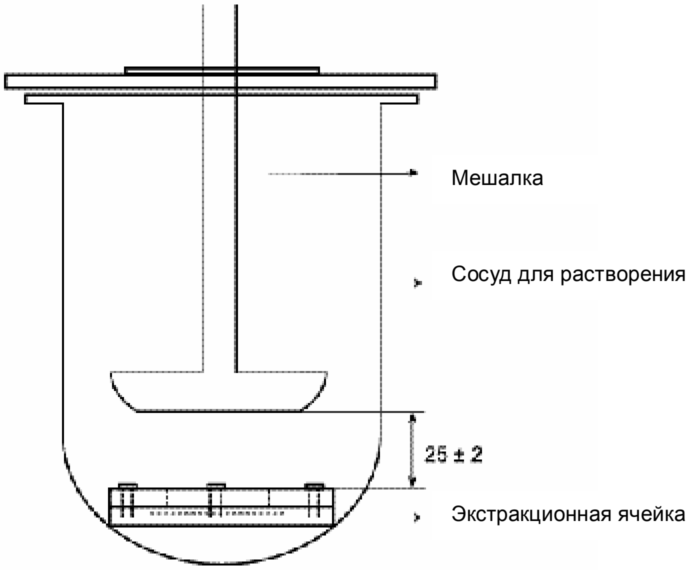


Рисунок 2.9.4.-4. – Мешалка над экстракционной ячейкой
Размеры указаны в миллиметрах

3. МЕТОД ВРАЩАЮЩЕГОСЯ ЦИЛИНДРА

Оборудование. Используют прибор с лопастью-мешалкой, описанный в тесте «Растворение» твердых дозированных форм *(2.9.3).* Мешалку и вал заменяют на элемент из нержавеющей стали, вращающийся цилиндр *(цилиндр*) (см. Рисунок 2.9.4.-5). Перед началом испытания пластырь помещают в *цилиндр*. Расстояние между внутренней поверхностью сосуда и цилиндром в процессе испытания составляет 25±2 мм. Испытание выполняют при температуре 32±0,5°С. Во время испытания сосуд следует закрывать, чтобы избежать испарения.

Методика. Указанное в частной статье количество среды растворения помещают в сосуд и доводят температуру до 32±0,5°С. Удаляют защитную ленту и помещают пластырь клейкой стороной на кусочек инертной пористой мембраны. Размер мембраны со всех сторон должен быть на 1 см больше пластыря. Пластырь помещают на чистую поверхность мембраны. Можно использовать два способа прикрепления пластыря:

- наносят подходящий клей на мембрану и, при необходимости, на заднюю поверхность пластыря;

- используют двустороннюю клейкую ленту, которую крепят к внешней стенке *цилиндра*.

Не сильно надавливая, тщательно прикрепляют пластырь не липкой стороной к цилиндру так, чтобы поверхность высвобождения находилась в контакте со средой растворения и ось пластыря соответствовала окружности *цилиндра*.

Предварительно следует проверить, не влияют ли клей или лента на результаты испытаний и не адсорбируются ли на них действующие вещества.

Цилиндр помещают в прибор и быстро вращают цилиндр со скоростью 100 об/мин. Через определенные промежутки времени отбирают пробу из участка между поверхностью среды растворения и верхушкой вращающегося цилиндра, не менее чем в 1 см от стенки резервуара.

Анализируют пробу, при необходимости дают поправку на изменение объема. Испытание повторяют с несколькими пластырями.

Оценка результатов. Лекарственное средство выдерживает испытание, если количество действующего вещества, высвобожденного из пластыря, во временных точках отбора проб, выраженное в количестве на единицу площади в единицу времени, соответствует предписанным пределам, указанным в частных статьях.

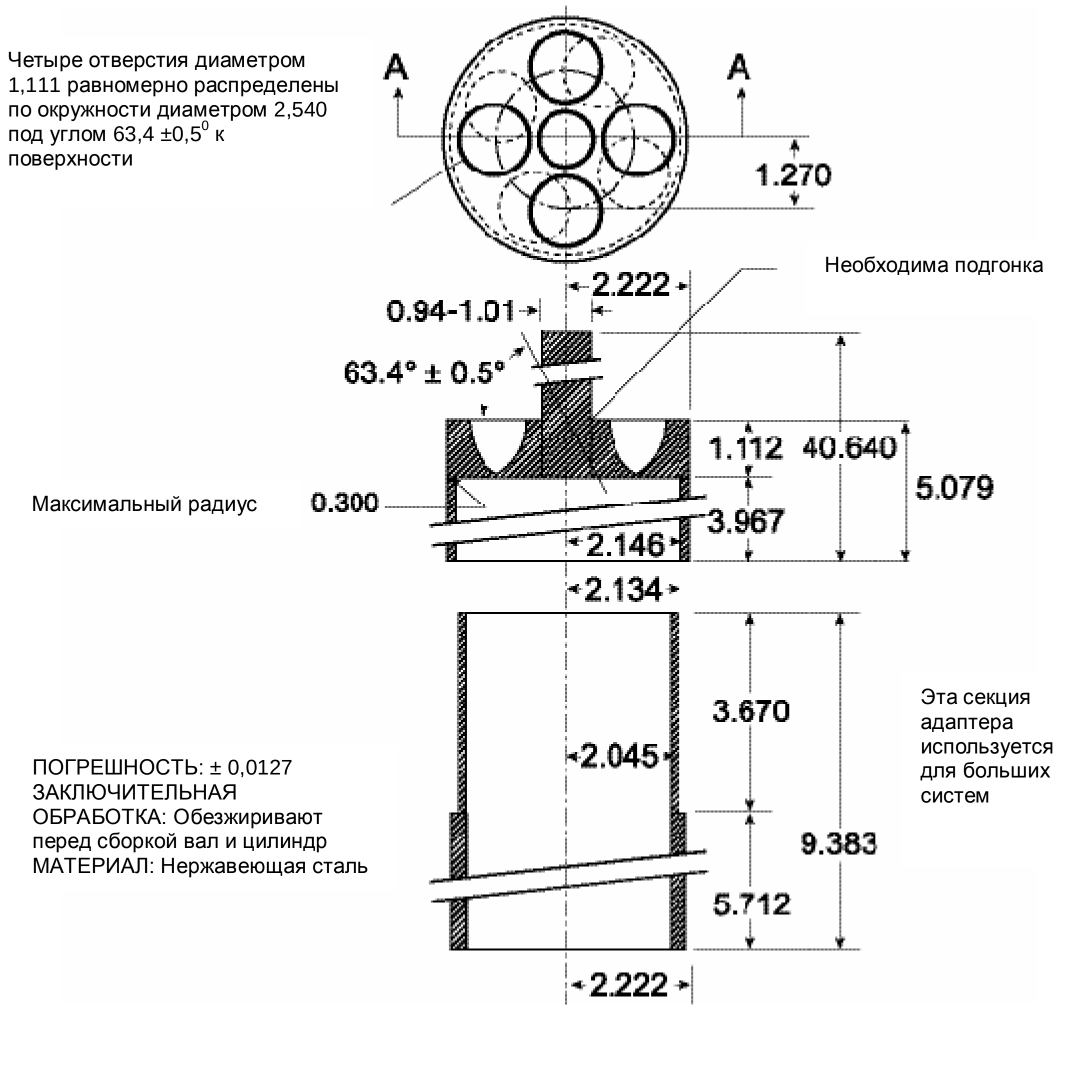


Рисунок 2.9.4.-5. – Элемент, вращающий цилиндр

Размеры указаны в сантиметрах

2.9.5. ОДНОРОДНОСТЬ МАССЫ ДЛЯ ЕДИНИЦЫ ДОЗИРОВАННОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА

20 единиц дозированного лекарственного средства или содержимое каждого из 20 контейнеров, в случае однодозовых лекарственных средств в индивидуальных контейнерах, отбирают по статистически обоснованной схеме, взвешивают каждую в отдельности и рассчитывают среднюю массу. Лекарственное средство считают выдержавшим испытание, если не более двух индивидуальных масс отклоняются от средней массы на величину, превышающую значение, указанное в Таблице 2.9.5.-1. При этом ни одна индивидуальная масса не должна отклоняться от средней массы на величину в два раза превышающую значение, указанное в Таблице 2.9.5.-1.

Таблица 2.9.5.-1

Лекарственная форма	Средняя масса	Допустимое отклонение, %
Таблетки (без оболочки и покрытые пленочной оболочкой)	80 мг и менее	10
	Более 80 мг, но менее 250 мг	7,5
	250 мг и более	5
Капсулы, гранулы (без покрытия, однодозовые) и порошки (однодозовые)	Менее 300 мг	10
	300 мг и более	7,5
Порошки для приготовления лекарственных средств для парентерального применения* (однодозовые)	Более 40 мг	10
Суппозитории и пессарии	Для всех случаев	5
Порошки для приготовления глазных капель и примочек (однодозовые)	Менее 300 мг	10
	300 мг и более	7,5
*Если средняя масса равна 40 мг и менее, лекарственное средство подлежит испытанию на однородность содержания действующего вещества в единице дозированного средства *(2.9.6).*		

Для капсул и порошков для приготовления лекарственных средств для парентерального применения испытание проводят, как описано ниже.

Данное испытание не проводится для поливитаминных лекарственных средств и для лекарственных средств, содержащих микроэлементы, если нет других указаний в частной статье.

КАПСУЛЫ

Взвешивают невскрытую капсулу. Затем вскрывают капсулу таким образом, чтобы не была потеряна какая-либо часть оболочки, и удаляют как можно полнее ее содержимое. В случае капсул с мягкой оболочкой промывают оболочку растворителем, указанным в частной статье, и оставляют на воздухе до удаления запаха растворителя. Затем взвешивают оболочку. По разности взвешиваний рассчитывают массу содержимого капсулы. Повторяют процедуру с другими 19 капсулами.

ПОРОШКИ ДЛЯ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕНЫХ СРЕДСТВ ДЛЯ ПАРЕНТЕРАЛЬНОГО ПРИМЕНЕНИЯ

Удаляют бумажную этикетку с поверхности контейнера. Контейнер моют и сушат. Затем контейнер вскрывают и тотчас взвешивают. Осторожно постукиванием освобождают как можно полнее, контейнер от содержимого, ополаскивают его, если необходимо, *водой Р* и затем *96 % спиртом Р* и сушат при температуре от 100^0С до 105^0С в течение 1 ч или, если природа контейнера не позволяет использовать нагревание при этой температуре, сушат при более низкой температуре до постоянной массы. Затем охлаждают в эксикаторе и взвешивают. По разности взвешиваний рассчитывают массу содержимого контейнера. Повторяют процедуру с другими 19 контейнерами.

2.9.6. ОДНОРОДНОСТЬ СОДЕРЖАНИЯ ДЕЙСТВУЮЩЕГО ВЕЩЕСТВА В ЕДИНИЦЕ ДОЗИРОВАННОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА

Испытание на однородность содержания действующего вещества в единице дозированного лекарственного средства основывается на количественном определении содержания в индивидуальных однодозовых единицах лекарственного средства с целью выяснения, находится ли это содержание внутри пределов, установленных по отношению к среднему содержанию в испытуемом образце.

Данное испытание не проводится для поливитаминных лекарственных средств и для лекарственных средств, содержащих микроэлементы, если нет других указаний в частных статьях.

Метод. Используя аналитическую методику, указанную в частной статье, определяют содержание действующего вещества в каждой из 10 дозированных единиц лекарственного средства, отобранных по статистически обоснованной схеме.

Применяют критерии тестов А,В или С как указано в статье для испытуемой дозированной формы.

ТЕСТ А

Таблетки, порошки для приготовления лекарственных средств для парентерального применения, глазные вставки, суспензии для инъекций. Лекарственное средство выдерживает испытание, если содержание в каждой его однодозовой единице находится в пределах 85 – 115 % от среднего содержания. Лекарственное средство не выдерживает испытание, если содержание более чем в одной единице выходит за вышеуказанные пределы или если содержание хотя бы в одной единице выходит за пределы 75 – 125 % от среднего содержания.

Если содержание в одной единице лекарственного средства выходит за пределы 85 -115 %, но находится в пределах 75 – 125 %, определяют содержание

в каждой из 20 дополнительных однодозовых единиц лекарственного средства, отобранных по статистически обоснованной схеме. Лекарственное средство выдерживает испытание, если содержание не более чем в одной из проанализированных 30 единиц выходит за пределы 85 – 115 % и ни в одной единице не выходит за пределы 75 -125 % от среднего содержания.

ТЕСТ В

Капсулы, порошки для приготовления лекарственных средств не для парентерального применения, гранулы, суппозитории, пессарии. Лекарственное средство выдерживает испытание, если содержание не более чем в одной единице выходит за пределы 85 – 115 % и ни в одной единице не выходит за пределы 75 – 125 % от среднего содержания в лекарственном средстве. Лекарственное средство не выдерживает испытание, если содержание более чем в трех единицах выходит за пределы 85 – 115 % от среднего содержания или если хотя бы в одной единице выходит за пределы 75 – 125 % от среднего содержания. Если содержание в двух или трех единицах лекарственного средства выходит за пределы 85 -115 %, но находится в пределах 75 – 125 %, определяют содержание в каждой из 20 дополнительных однодозовых единиц лекарственного средства, отобранных по статистически обоснованной схеме. Лекарственное средство выдерживает испытание, если содержание не более чем в трех из проанализированных 30 единиц выходит за пределы 85 – 115 % и ни в одной единице не выходит за пределы 75 -125 % от среднего содержания.

ТЕСТ С

Трансдермальные пластыри. Лекарственное средство выдерживает испытание, если среднее содержание в 10 однодозовых единицах находится в пределах 90 – 110 % от содержания, указанного в разделе «Состав», и если содержание в каждой из 10 единиц находится в пределах 75 – 125 % от среднего содержания.

2.9.7. ПРОЧНОСТЬ ТАБЛЕТОК БЕЗ ОБОЛОЧКИ НА ИСТИРАНИЕ

Испытание позволяет определить истираемость таблеток без оболочки при определенных условиях, т.е. повреждения поверхности таблеток под воздействием механического удара или истирания.

ПРИБОР

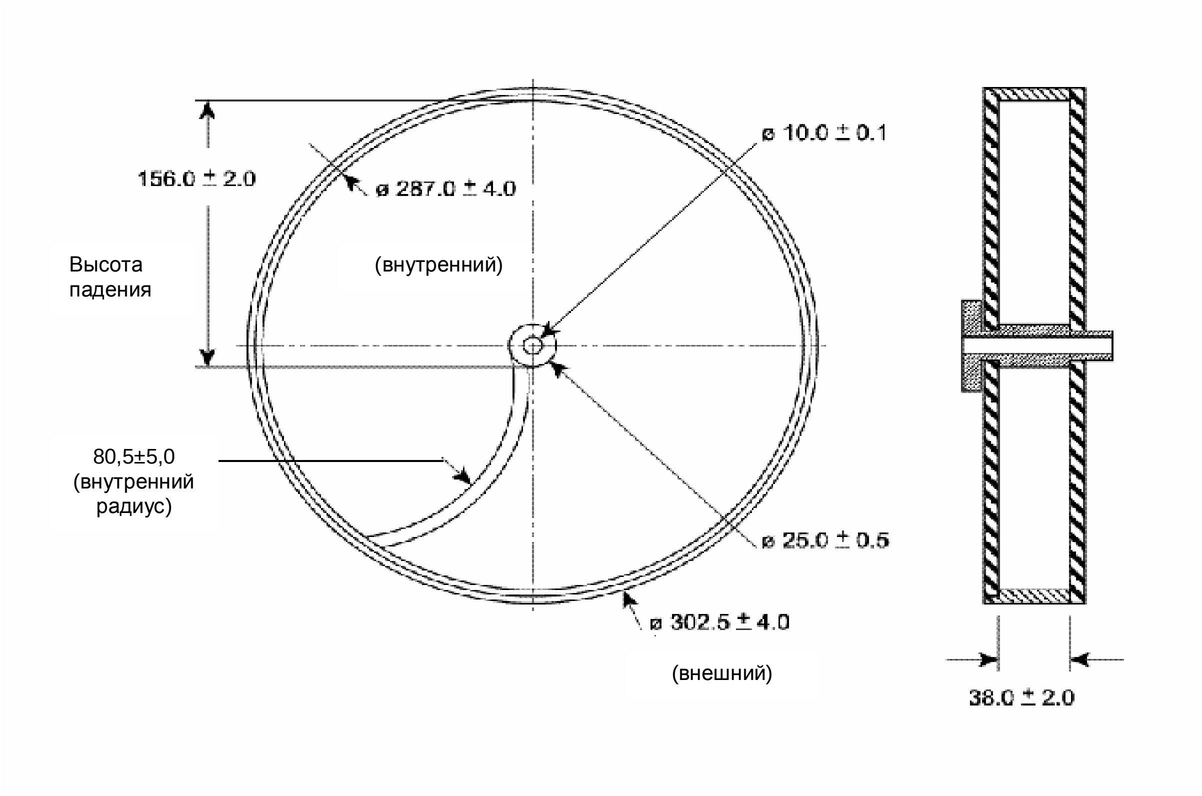


Рисунок 2.9.7.-1. – Прибор для определения прочности таблеток на истирание
Размеры указаны в миллиметрах

Используют барабан с внутренним диаметром от 283 мм до 291 мм и глубиной от 36 мм до 40 мм, изготовленный из прозрачного синтетического полимера; внутренние поверхности барабана должны быть отполированы и не должны электризоваться (см. Рисунок 2.9.7.-1). Одна сторона барабана съемная. При каждом обороте барабана таблетки приводятся в движение посредством изогнутой лопасти с внутренним диаметром от 75,5 мм до 85,8 мм, расположенной между центром барабана и его наружной стенкой. Барабан крепится к горизонтальной оси устройства, обеспечивающего скорость вращения около 25±1 об/мин. Таким образом, при каждом обороте барабана таблетки падают, переворачиваясь или скользя, на стенку барабана или друг на друга.

МЕТОДИКА

При массе одной таблетки менее 0,65 г для испытания берут 20 таблеток; при массе одной таблетки более 0,65 г – 10 таблеток. Таблетки помещают на сито №1000 и тщательно удаляют пыль посредством сжатого воздуха или мягкой кисточки. Таблетки взвешивают (точная навеска) и помещают в барабан. После 100 оборотов барабана таблетки извлекают и снова тщательно удаляют пыль. Если ни на одной из таблеток нет сколов или трещин, таблетки взвешивают с точностью до 0,001 г.

Обычно испытание проводят один раз. Если полученные результаты вызывают сомнение или потеря в массе превышает 1 %, испытание повторяют еще дважды и вычисляют среднее из трех измерений. Если нет других указаний в частной статье, потеря в массе должна быть не более 1 % от суммарной массы испытуемых таблеток.

При испытании таблеток с диаметром 13 мм и более для получения воспроизводимых результатов может возникнуть необходимость отрегулировать барабан таким образом, чтобы лежащие рядом таблетки не упирались друг в

друга и имели возможность падать свободно. Обычно достаточно установить ось под углом 10^0 к основанию.

ПРЕДСТАВЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Прочность таблеток на истирание выражается потерей в массе, вычисленной в процентах от исходной массы испытуемых таблеток.

Необходимо указывать число таблеток, взятых для испытания.

Допускается использование прибора (см. Рисунок 2.9.7.-2), который состоит из барабана диаметром около 200 мм и глубиной около 38 мм; внутренние поверхности барабана, изготовленного из прозрачного синтетического полимера, должны быть отполированы и не должны электризоваться. Одна сторона барабана съемная. По внутреннему периметру стенки расположены 12 лопастей (35 мм x 35 мм) под углом 20^0 к касательной барабана, которые при его вращении приводят в движение таблетки. Барабан крепится к горизонтальной оси устройства, обеспечивающего скорость вращения около 20 об/мин. Прибор снабжен часами, которые автоматически включают устройство по истечении заданного времени испытания.

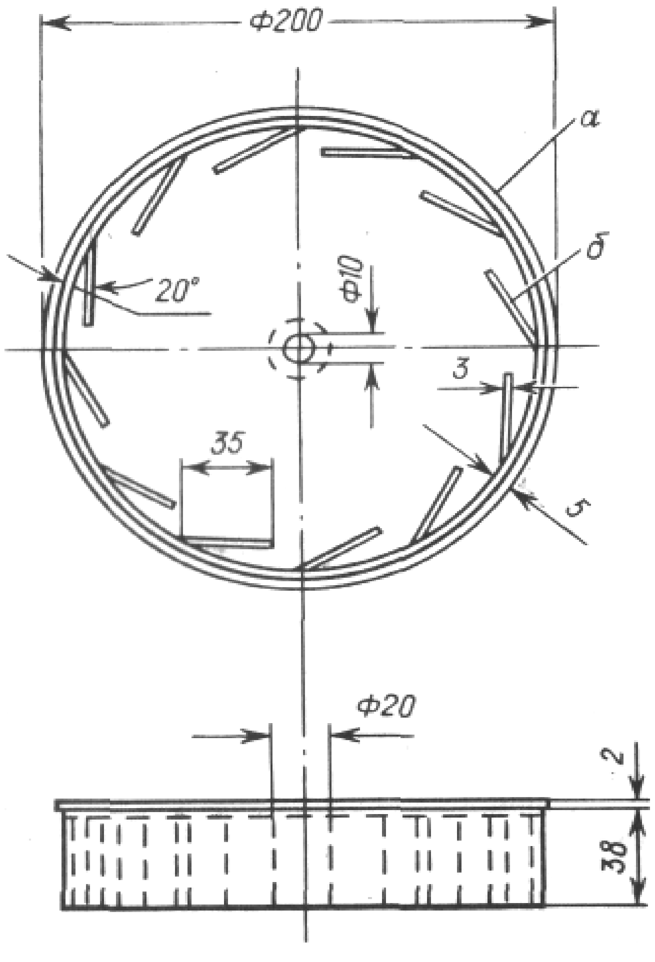


Рисунок 2.9.7.-2. – Прибор для определения прочности таблеток на истирание
Размеры указаны в миллиметрах

МЕТОДИКА

10 таблеток, обеспыленных и взвешенных с точностью до 0,001 г, помещают в барабан, привинчивают крышку и включают устройство на 5 мин, что

соответствует 100 об/мин. По истечении установленного времени таблетки обеспыливают и определяют их массу с точностью до 0,001 г.

ПРЕДСТАВЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Прочность таблеток на истирание в процентах (П) вычисляют по формуле:

$$П = 100 \cdot \frac{P_{нач} - P_{кон}}{P_{нач}} \cdot 100,$$

где:

$P_{нач}$ – масса таблеток до истирания, в граммах;

$P_{кон}$ – масса таблеток после истирания, в граммах.

Форма таблеток не должна изменяться в процессе испытания. Если хотя бы из 10 испытуемых таблеток обнаруживаются трещины или сколы, испытание проводят дополнительно на 20 таблетках.

2.9.8. ПРОЧНОСТЬ ТАБЛЕТОК НА СЖАТИЕ

Испытание позволяет определить прочность таблеток на сжатие при определенных условиях путем измерения силы, необходимой для разрушения таблеток.

ПРИБОР

Прибор представляет собой два расположенные друг против друга зажима, один из которых может перемещаться по направлению к другому. Плоскости поверхностей зажимов перпендикулярны направлению движения. Сдавливающие поверхности зажимов должны быть плоскими и превосходить по размеру зону контакта с таблеткой. Прибор калибруют с использованием системы, обеспечивающей точность 1 Н.

МЕТОДИКА

Таблетку помещают между зажимами, принимая во внимание ее форму, а также разделительную линию и надпись, если они есть. Для всех измерений таблетка должна быть ориентирована одинаково по отношению к направлению прилагаемой силе. Измерения проводят для 10 таблеток. Перед каждым измерением тщательно удаляют все фрагменты предыдущей таблетки.

Эта процедура не применима при использовании полностью автоматизированного прибора.

ПРЕДСТАВЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Необходимо указывать среднее, минимальное и максимальное значения измеренной силы в Н.

Также указывают тип использованного прибора и, если необходимо, ориентацию таблеток.

Таблетки должны иметь прочность на сжатие не ниже значений, указанных в таблице 2.9.8.-1, если нет других указаний в частной статье.

Таблица 2.9.8.-1

Диаметр, мм	Прочность на сжатие, Н
6	10
7	20
8	25
9	30
10	30
11	40
12	50
13	50

Для таблеток, предназначенных для измельчения или разжевывания, в частной статье указывают верхний предел прочности на сжатие.

2.9.9. ИЗМЕРЕНИЕ КОНСИСТЕНЦИИ МЕТОДОМ ПЕНЕТРОМЕТРИИ

Испытание позволяет измерить в определенных и валидированных условиях проникновение объекта в испытуемый образец, находящегося в контейнере определенной формы и размера.

ПРИБОР

Прибор состоит из пенетрометра, представляющего собой штатив и проникающий объект. Образец прибора показан на Рисунке 2.9.9.-1.

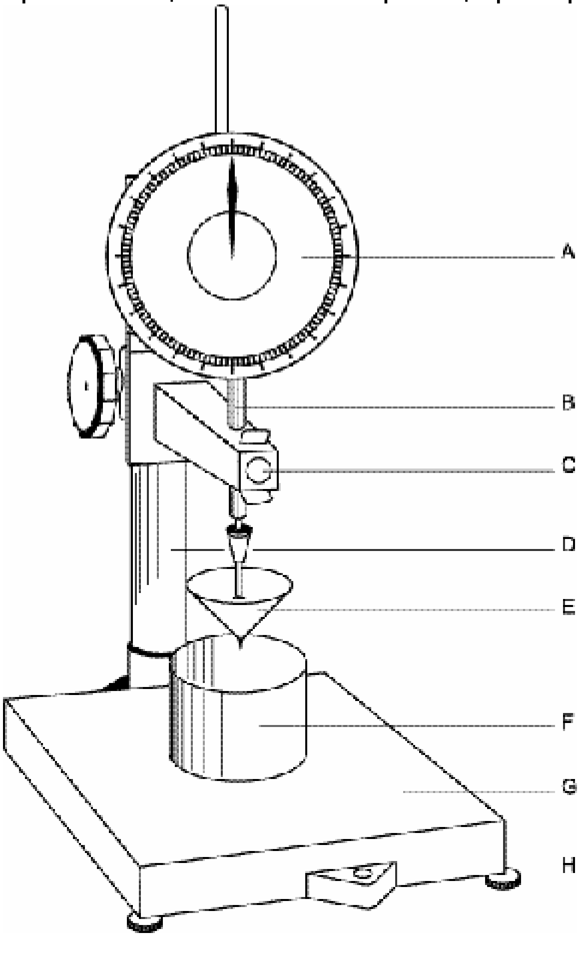


Рисунок 2.9.9.-1. – Пенетрометр

А. Шкала, показывающая глубину проникновения, проградуированная в десятичных долях миллиметра.

B. Вертикальный стержень, который поддерживает и вводит проникающий объект.

C. Устройство для автоматического введения проникающего объекта в течение постоянного времени.

D. Устройство, обеспечивающее вертикальное положение проникающего объекта и горизонтальное положение основания.

E.Проникающий объект (см. рисунки 2.9.2. – 2 и 3).

F. Контейнер.

G. Горизонтальное основание.

H. Контроль горизонтального положения основания.

Штатив состоит из:

- вертикального стержня, который поддерживает и направляет проникающий объект;
- горизонтального основания;
- устройства, которое обеспечивает вертикальное положение проникающего объекта;
- устройства, которое поддерживает горизонтальное положение основания;
- устройство для ввода и извлечения проникающего объекта;
- шкалы, проградуированной в десятичных долях миллиметра, показывающей глубину проникновения.

Проникающий объект изготовлен из соответствующего материала, имеет гладкую поверхность и определенную форму, размер и массу.

Пример проникающего объекта показан на Рисунках 2.9.9.-2 и 2.9.9.-3.

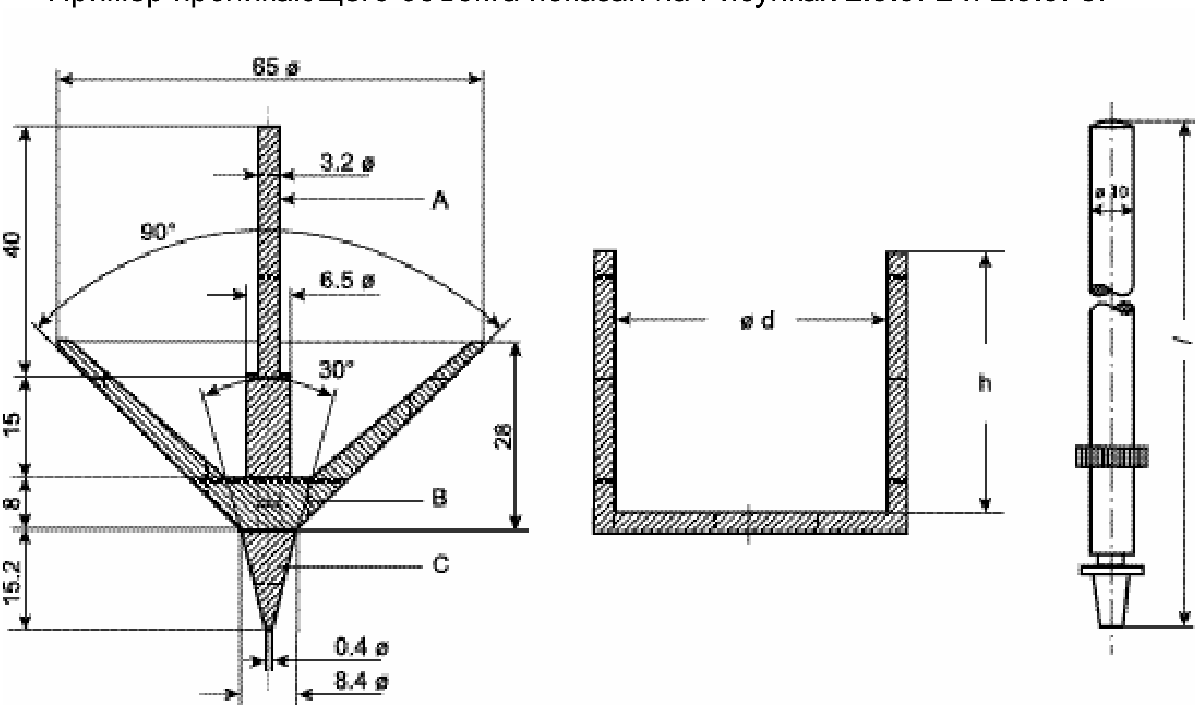


Рисунок 2.9.9.-2

Воронка (m = 102,5 г), контейнер (d = 102 мм или 75 мм, h ≥ 62 мм) и стержень (l=162 мм, m = 47,5 г).

Размеры указаны в миллиметрах

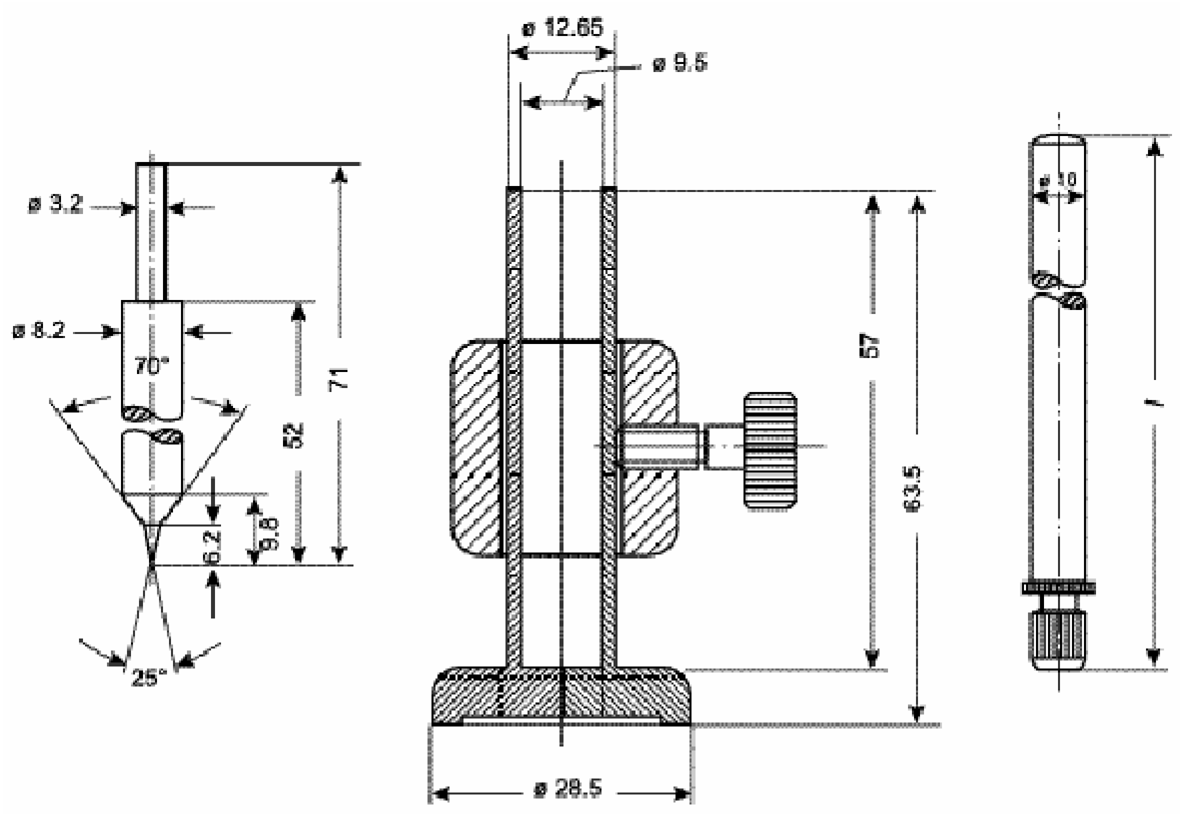


Рисунок 2.9.9.-3

Микроворонка (m=7,0 г), контейнер и стержень (l = 116 мм, m = 16,8 г)

Размеры указаны в миллиметрах

МЕТОДИКА

Перед испытанием образец подготавливают одним из методов:

A. Аккуратно наполняют доверху три контейнера, исключая попадание пузырьков воздуха. Если необходимо, разглаживают поверхность и выдерживают образцы при температуре 25±0,5^{0}С в течение 24 ч, если нет других указаний в частной статье.

B. Три испытуемых образца выдерживают при температуре 25±0,5^{0}С в течение 24 ч. В течение 5 мин подходящим способом нарезают образцы и аккуратно наполняют три контейнера доверху, исключая попадание пузырьков воздуха. Если необходимо, разглаживают поверхность.

C. Расплавляют три испытуемых образца и аккуратно наполняют три контейнера доверху, исключая попадание пузырьков воздуха. Образцы выдерживают при температуре 25±0,5^{0}С в течение 24 ч, если нет других указаний в частной статье.

Определение проникновения. На основание пенетрометра помещают испытуемый образец. Проверяют, чтобы поверхность образца была перпендикулярна к вертикальной оси проникающего объекта. Доводят температуру проникающего объекта до 25±0,5^{0}С и устанавливают в таком положении, чтобы наконечник слегка касался поверхности образца. Проникающий объект разблокировывают и выдерживают в таком состоянии 5 с. Затем проникающий объект фиксируют и измеряют глубину проникновения. Испытание повторяют с двумя оставшимися контейнерами.

ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ

Проникновение выражают десятых долях миллиметра как среднее значение трех измерений. Если один из индивидуальных результатов отличается от среднего значения больше чем на 3 %, испытание повторяют и вычисляют среднее значение и относительное среднеквадратичное отклонение шести испытаний.

2.9.10 СОДЕРЖАНИЕ ЭТАНОЛА

Данный метод предназначен только для испытания жидких фармацевтических лекарственных средств, содержащих спирт. Эти лекарственные средства также могут содержать растворенные вещества, которые могут быть отделены от спирта дистилляцией (отгонкой). Если при дистилляции могут отгоняться, кроме спирта и воды, другие летучие вещества, это следует указывать в частной статье.

Содержание этанола в жидкости выражают количеством объемов этанола, содержащихся в 100 объемах жидкости при температуре 20±0,1°С. Эта характеристика называется «процентное содержание этанола по объему» (*об/об*). Содержание этанола можно также выражать в граммах этанола в 100 г жидкости. Эта характеристика называется «процентное содержание этанола по массе» *(м/м).*

Соотношение плотности при температуре 20±0,1°С, относительной плотности (в вакууме) и содержания этанола в смеси воды и спирта представлено в таблицах Международной организации официальной метрологии (1972), Международная рекомендация №22.

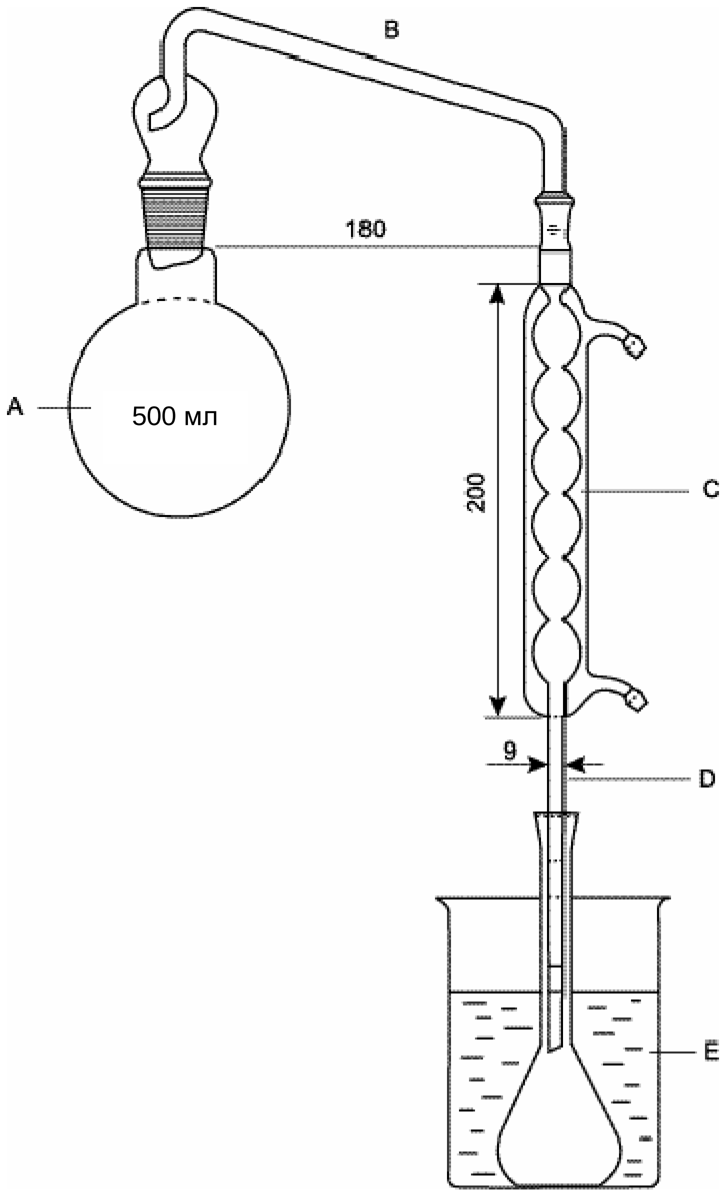


Рисунок 2.9.10.-1. – Прибор для определения содержания этанола.
Размеры указаны в миллиметрах.

ПРИБОР

Прибор (Рисунок 2.9.10.-1) представляет собой колбу с круглым дном (*A*), имеющую переходник (*B*) с улавливателем водяного пара, соединенную с вертикальным холодильником (*C*). Нижняя часть холодильника соединена с трубкой (*D*), через которую дистиллят поступает в нижнюю часть мерной колбы вместимостью 100 или 250 мл. Во время дистилляции мерная колба погружена в смесь льда и воды (*E*). Для предотвращения обугливания растворенных веществ под колбой (*A*) помещают диск, который имеет круглое отверстие диаметром 6 см.

Методика

Пикнометрический метод. 25,0 мл испытуемого лекарственного средства, измеренных при температуре 20±0,1°С, помещают в дистилляционную колбу. Доводят объем до 100 мл или 150 мл *дистиллированной водой Р* и прибавляют несколько кусочков пемзы, # фарфора или капилляра. Присоединяют переходник и холодильник. Отгоняют и собирают в мерную колбу вместимостью 100 мл не

менее 90 мл дистиллята (отгона). Температуру отгона доводят до температуры 20±0,1°C и разбавляют до 100 мл *дистиллированной водой Р* с температурой 20±0,1°C. Определяют относительную плотность отгона с помощью пикнометра при температуре 20±0,1°C.

По Таблице 2.9.10 -1 (колонка 3) находят содержание этанола в отгоне и вычисляют содержание этанола в лекарственном средстве *(об/об)* путем умножения найденного табличного значения на четыре. Полученный результат округляют до десятичного знака.

Таблица 2.9.10.-1

Соотношение между плотностью, относительной плотностью и содержанием этанола.

ρ_{20} (кг·м$^{-3}$)	**Относительная плотность дистиллята на воздухе,** d_{20}^{20}	**Содержание этанола в процентах об/об при 20 °C**
968,0	0,9697	25,09
968,5	0,9702	24,64
969,0	0,9707	24,19
969,5	0,9712	23,74
970,0	0,9717	23,29
970,5	0,9722	22,83
971,0	0,9727	22,37
971,5	0,9733	21,91
972,0	0,9738	21,45
972,5	0,9743	20,98
973,0	0,9748	20,52
973,5	0,9753	20,05
974,0	0,9758	19,59
974,5	0,9763	19,12
975,0	0,9768	18,66
975,5	0,9773	18,19
976,0	0,9778	17,73
976,5	0,9783	17,25
977,0	0,9788	16,80
977,5	0,9793	16,34
978,0	0,9798	15,88
978,5	0,9803	15,43
979,0	0,9808	14,97
979,5	0,9813	14,52
980,0	0,9818	14,07
980,5	0,9823	13,63
981,0	0,9828	13,18
981,5	0,9833	12,74
982,0	0,9838	12,31
982,5	0,9843	11,87
983,0	0,9848	11,44
983,5	0,9853	11,02
984,0	0,9858	10,60
984,5	0,9863	10,18
985,0	0,9868	9,76
985,5	0,9873	9,35
986,0	0,9878	8,94

986,5	0,9883	8,53
987,0	0,9888	8,13
987,5	0,9893	7,73
988,0	0,9898	7,34
988,5	0,9903	6,95
989,0	0,9908	6,56
989,5	0,9913	6,17
990,0	0,9918	5,79
990,5	0,9923	5,42
991,0	0,9928	5,04
991,5	0,9933	4,67
992,0	0,9938	4,30
992,5	0,9943	3,94
993,0	0,9948	3,58
993,5	0,9953	3,22
994,0	0,9958	2,86
994,5	0,9963	2,51
995,0	0,9968	2,16
995,5	0,9973	1,82
996,0	0,9978	1,47
996,5	0,9983	1,13
997,0	0,9988	0,80
997,5	0,9993	0,46
998,0	0,9998	0,13

Гидрометрический метод. 50,0 мл испытуемого лекарственного средства, измеренных при температуре 20±0,1°С, помещают в дистилляционную колбу, добавляют от 200 мл до 300 мл *дистиллированной воды Р* и выполняют дистилляцию как описано выше, собирая в мерную колбу вместимостью 250 мл не менее 180 мл дистиллята. Температуру отгона доводят до 20±0,1°С и разбавляют до 250 мл *дистиллированной водой Р* с температурой 20±0,1°С.

Помещают отгон в цилиндр, диаметр которого должен быть на 6 мм шире утолщения ареометра. Если объем дистиллята недостаточен, удваивают количество испытуемого лекарственного средства и дистиллят разбавляют до 500 мл *дистиллированной воды Р* с температурой 20±0,1°С.

Вносят поправку на разведение путем умножения найденного значения на пять. По Таблице 2.9.10.-1.-1 вычисляют процентное содержание этанола в лекарственном средстве *(об/об)* и результат округляют до десятичного знака.

Если испытуемое лекарственное средство содержит летучие вещества – эфир, эфирные масла, хлороформ, камфору, летучие кислоты или основания, свободный йод и др., его предварительно обрабатывают. Испытуемое лекарственное средство, содержащий эфир, эфирные масла, хлороформ или камфору помещают в делительную воронку, прибавляют равный объем *раствора натрия хлорида насыщенного Р* и такой же объем *петролейного эфира Р*. Смесь взбалтывают в течение 3 мин. После разделения слоев водно-спиртовой слой сливают в другую делительную воронку и обрабатывают таким же способом половинным количеством *петролейного эфира Р*. Водно-спиртовой слой сливают в дистилляционную колбу. Эфирные извлечения объединяют и взбалтывают с половинным количеством *раствора натрия хлорида насыщенного Р*. После

разделения слоев водно-спиртовой слой присоединяют к жидкости, находящейся в дистилляционной колбе.

Если испытуемое лекарственное средство содержит спирта менее 30 %, то высаливание проводят не *раствором натрия хлорида насыщенного Р*, а 10 г *натрия хлорида Р*.

При содержании в испытуемом лекарственном средстве летучих веществ их нейтрализуют раствором щелочи, при содержании летучих оснований – *кислотой фосфорной Р* или *кислотой серной Р*.

Испытуемые лекарственные средства, содержащие свободный йод, перед дистилляцией обрабатывают *порошком цинка Р* или рассчитанным количеством *натрия тиосульфата Р* до обесцвечивания. Для связывания летучих сернистых соединений прибавляют несколько капель *раствора натрия гидроксида Р*.

МЕТОДИКА

Точный объем исследуемого лекарственного средства, измеренного при температуре 20±0,1°С, помещают в дистилляционную колбу. При содержании спирта в испытуемом лекарственном средстве до 20 % для определения берут 75 мл жидкости, от 20 % до 50 % - 50 мл, от 50 % и выше – 25 мл. Доводят объем до 75 мл *дистиллированной водой Р* и прибавляют несколько кусочков пемзы, фарфора или капилляра. Если жидкость при дистилляции сильно пенится, прибавляют 2-3 мл *кислоты серной Р* или *кислоты фосфорной Р*, 2-3 г *кальция хлорида Р* или *парафина Р*. Присоединяют переходник и холодильник. Отгоняют и собирают в мерную колбу вместимостью 50 мл не менее 48 мл отгона. Температуру отгона доводят до 20±0,1°С и разбавляют до 50 мл *дистиллированной водой Р* с температурой 20±0,1°С. Отгон должен быть прозрачным или слегка мутным.

Определяют относительную плотность дистиллята с помощью пикнометра при 20±0,1°С и по алкоголеметрической Таблице 2.9.10-2 находят содержание этанола в процентах по объему.

Содержание этанола в лекарственном средстве (X) в процентах по объему вычисляют по формуле:

$$X = \frac{50 \cdot a}{á},$$

где:

50 – объем отгона, мл;

а – содержание этанола в процентах по объему, найденное по Таблице 2.9.10-2;

б – объем испытуемого лекарственного средства, взятый для отгона, мл.

Определение этанола методом газовой хроматографии. Определение проводят методом газовой хроматографии *(2.2.28).*

Раствор внутреннего стандарта. Готовят раствор, содержащий 5,0 % *(об/об) этанола Р* и 5,0 % (*об/об*) *пропанола Р*.

Испытуемый раствор. Испытуемый раствор разводят *водой Р* до содержания этанола от 4,0 % до 6,0 % (*об/об*).

Стандартный раствор. Готовят аналогично испытуемому раствору, прибавляя такое содержание *пропанола Р*, чтобы получился раствор, содержащий 5,0 % (*об/об*) пропанола.

Хроматографирование проводят на газовом хроматографе с пламенно-ионизационном детектором в следующих условиях:

- колонка стеклянная размером 1,5 м х 4 мм, заполненная *сополимером этилвинилбензол-дифенилбензолом Р* с размером частиц 125-150 мкм или аналогичная колонка, для которой выполняются требования пригодности хроматографической системы;
- температура колонки – 150^{0}С;
- температура испарителя и детектора – 170^{0}С.

Попеременно хроматографируют по 1 мкл каждого из растворов.

Вычисляют процентное содержание этанола по объему по площади пика этанола на хроматограммах раствора внутреннего стандарта и стандартного раствора.

2.9.11. ИСПЫТАНИЕ НА СОДЕРЖАНИЕ МЕТАНОЛА И 2-ПРОПАНОЛА

Испытания проводят методом газовой хроматографии *(2.2.28).*

Раствор внутреннего стандарта. Готовят раствор, содержащий 2,5% об/об *пропанола Р*.

Испытуемый раствор. К точному количеству дистиллята прибавляют 2,0 мл раствора внутреннего стандарта. Содержание этанола *(2.9.10)* доводят до 10,0% об/об либо разведением *водой Р* до 50 мл, либо добавлением этанола *Р1* (90% об/об).

Раствор стандарта. Готовят 50 мл раствора, содержащего 2,0 мл раствора внутреннего стандарта, 10% об/об *этанола Р1*, 0,05% об/об *2-пропанола Р* и количество *безводного метанола Р*, достаточное для получения концентрации 0,05% об/об, учитывая метанол, содержащийся в *этаноле Р*.

Хроматографирование проводят на газовом хроматографе с пламенно-ионизационным детектором в следующих условиях:

- колонка стеклянная 2 м длиной и внутренним диаметром 2 мм, заполненная *этилвинилбензол-дивинилбензоловым сополимером Р* (125-150 мкм) или аналогичная колонка, для которой выполняются требования пригодности хроматографической системы;
- газ-носитель – *азот для хроматографии Р*, скорость потока газа 30 мл/мин;
- температура колонки - 130°C, температура испарителя - 200°C, температура детектора - 220°C.

Вводят по 1 мкл каждого раствора.

Содержание метанола и 2-пропанола рассчитывают в пересчете на исходный образец.

Данный метод позволяет определить метанол и 2-пропанол в концентрации менее 0,025% (*об/об).*

2.9.12. СИТОВОЙ АНАЛИЗ

Степень измельчения порошка может быть выражена размерами отверстий сит в соответствии с Таблицей 2.1.4.-1 *(2.1.4).*

Степень измельчения порошка определяют просеиванием через сита с определенными номерами и выражают нижеуказанными терминами. Если такие термины не могут быть использованы, степень измельчения выражают в процентах вещества *(м/м),* проходящего через сито определенного размера.

При описании порошков используют следующую терминологию:

Грубый порошок. Не менее 95% массы порошка проходит через сито номер 1400 и не более 40% массы порошка проходит через сито номер 355.

Средне-мелкий порошок. Не менее 95% массы порошка проходит через сито номер 355 и не более 40% массы порошка проходит через сито номер 180.

Мелкий порошок. Не менее 95% массы порошка проходит через сито номер 180 и не более 40% массы порошка проходит через сито номер 125.

Очень мелкий порошок. Не менее 95% массы порошка проходит через сито номер 125 и не более 40% массы порошка проходит через сито номер 90.

Если указано сито одного номера, не менее 97% массы порошка должно проходить через указанное сито, если нет других указаний в частной статье.

Для определения степени измельчения порошка собирают сита, порошок полностью просеивают и взвешивают каждую фракцию.

Если нет других указаний в частной статье, грубые, средне-мелкие порошки в количестве 25-100 г помещают на соответствующее сито, встряхивают в течение 10 мин, периодически постукивая по ситу. Для мелких и очень мелких порошков навеска образца не должна превышать 25 г, сито встряхивают в течение 20 мин. Если порошки закупоривают отверстия во время просеивания, допускается осторожно прочищать нижнюю поверхность сита. Навеску порошка, время и условия просеивания указывают в частной статье.

2.9.13. ОПРЕДЕЛЕНИЕ РАЗМЕРА ЧАСТИЦ МЕТОДОМ МИКРОСКОПИИ

Взвешивают необходимое количество испытуемого порошка (например, 10-100 мг) и суспендируют в 10,0 мл указанной в частной статье жидкости, в которой порошок не растворяется, если необходимо прибавляют вещество, улучшающее смачиваемость. Порцию гомогенной суспензии помещают в подходящую счетную ячейку и просматривают под микроскопом площадь, соответствующую не менее 10 мкг испытуемого порошка. Подсчитывают все частицы, имеющие размеры более допустимого предела. Допустимый предел размера и допустимое количество частиц, размер которых превышает предел, указывают в частной статье.

2.9.14. УДЕЛЬНАЯ ПЛОЩАДЬ ПОВЕРХНОСТИ

Испытание предназначено для измерения удельной площади поверхности сухих порошков, прошедших сквозь сито, и выражается в $м^2$/г. Молекулярный поток, который может повлиять на результаты испытания порошков, размеры частиц которых составляют несколько микрометров, не учитывают в уравнении, которое используется для расчета удельной площади поверхности.

ПРИБОР

Прибор состоит из следующих частей:

(а) *пропускная камера* (см. Рисунок 2.9.14.-1), состоящая из цилиндра, имеющего внутренний диаметр 12,6±0,1 мм *(А)*, изготовленного из стекла или нержавеющего металла. Дно камеры герметично соединено (например, посредством адаптера) с манометром (Рисунок 2.9.14.-2). На расстоянии 50±15 мм от верхушки ячейки имеется выступ, шириной 0,5-1 мм. На выступе фиксируется перфорированный металлический диск *(В),* выполненный из нержавеющего металла, толщиной 0,9±0,1 мм. Диск перфорирован 30-40 отверстиями с диаметром 1 мм, равномерно распределенными по всей поверхности.

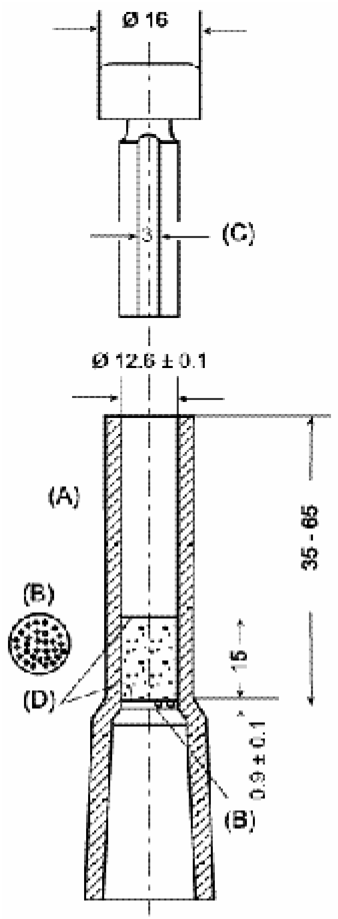


Рисунок 2.9.14.-1. – Пропускная камера
Размеры указаны в миллиметрах.

Поршень *(C)* изготовлен из нержавеющего металла и подогнан к камере с точностью до 0,1 мм. Дно поршня имеет острые края справа по отношению к центральной оси. На одной стороне поршня имеется воздушный дренаж длиной 3 мм и 0,3 мм глубиной. Верхушка поршня имеет воротник, который при погружении поршня в камеру соприкасается с верхушкой. Расстояние между дном поршня и верхушкой перфорационного диска *(B)* составляет 15±1 мм.

Диски из фильтровальной бумаги *(D)* имеют мягкие края и диаметр, совпадающий с камерой.

(в) *U-образный манометр (E)* (Рисунок 2.9.14.-2) изготовлен из стеклянной трубки с внешним диаметром 9 мм и внутренним диаметром 7 мм. Верхушка одного из плеч манометра герметично соединена с пропускной камерой *(F).* На плечо манометра, соединенное с пропускной камерой, нанесена линия, на 125-145 мм ниже верхушки выпускного отверстия, расположенного сбоку. Еще три линии расположены на 15 мм, 70 мм и 110 мм выше этой линии *(G).* Выпускное отверстие, расположенное на 250-305 мм выше дна манометра, используется для освобождения плеча манометра, соединенного с пропускной камерой. Кран выпускного отверстия располагается не далее, чем на 50 мм от плеча манометра.
Манометр установлен таким образом, чтобы его плечи были расположены вертикально. До нижней метки он заполнен *дибутилфталатом Р*, содержащим липофильную краску.

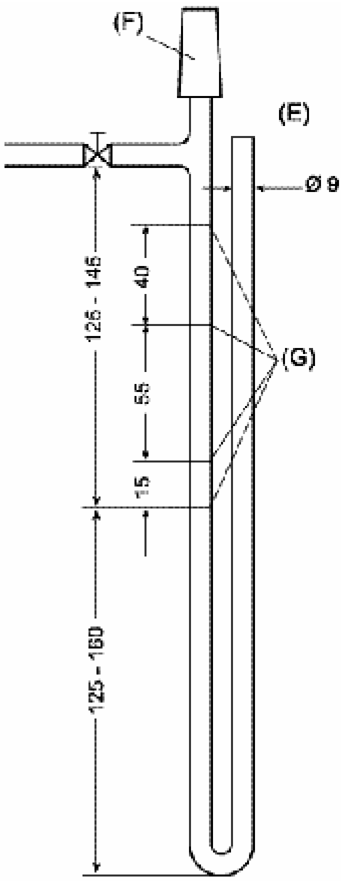


Рисунок 2.9.14.-2. - Манометр
Размеры указаны в миллиметрах

МЕТОДИКА

Испытуемый порошок следует предварительно высушить и пропустить через сито (например, №125). Массу порошка, необходимую для выполнения испытания, рассчитывают по формуле:

$$M = V \cdot P \cdot (1 - e), \quad (1)$$

где:

V - насыпной объем уплотненного слоя порошка;
ρ - плотность испытуемого вещества (г/мл);
e - пористость уплотненного слоя.

Изначально пористость принимают равной 0,5 и учитывают при расчете массы (M) испытуемого порошка по формуле (1).

Фильтровальный диск помещают на верхушку металлического диска *(B).* Взвешивают необходимое количество испытуемого порошка с точностью до 0,001 г. Помещают порошок в чистую, взвешенную пропускную камеру, осторожно заполняют камеру и накрывают слой порошка вторым фильтровальным диском. Медленно сдавливают порошок поршнем, стараясь избегать вращения. Надавливают на поршень до тех пор, пока он полностью не погрузится в пропускную камеру. Если это невозможно, следует уменьшить количество порошка, взятого для испытания. Если, напротив, сопротивление недостаточное, следует увеличить количество порошка. В этом случае пористость нужно рассчитать еще раз. Через 10 с поршень удаляют. Пропускную камеру соединяют с манометром. Отсасывают из манометра воздух с помощью резиновой груши до

тех пор, пока уровень окрашенной жидкости не установится на уровне верхней метки. Перекрывают кран и проверяют герметичность прибора, закрыв верхний конец камеры, например, резиновой пробкой. Удаляют пробку и с помощью таймера замеряют время, необходимое для опускания столбика жидкости со второй до третьей метки.

Полученное значение используют при расчете удельной площади поверхности (S), которую выражают в м^2/г, с помощью следующего уравнения:

$$S = \frac{K \cdot \sqrt{e^3} \cdot \sqrt{t}}{r \cdot (1 - e) \cdot \sqrt{n}}, \qquad (2)$$

где:

t - время, необходимое для опускания столбика жидкости со второй до третьей метки, с;

η - динамическая вязкость воздуха, мПа/с (см. Таблицу 2.9.14.-1);

K - константа аппарата, которая рассчитывается по формуле (4);

ρ - плотность испытуемого вещества, г/мл;

e - пористость компактного слоя порошка.

ГРАДУИРОВКА ПРИБОРА

Насыпной объем компактного слоя порошка определяют методом ртутного смещения: два фильтровальных диска помещают в пропускную камеру. Края опускают с помощью стержня, имеющего немного меньший диаметр, чем диски. Наполняют камеру ртутью, со стенок камеры удаляют воздух. Если камера изготовлена из материала, который взаимодействует с ртутью, предварительно смазывают камеру и металлический диск тонким слоем *парафина Р*. Сливают ртуть в стакан и определяют массу (M_A) и температуру ртути.

Образуют компактный слой стандарта испытуемого вещества и опять наполняют камеру ртутью до верха камеры. Сливают ртуть в предварительно взвешенный стакан и измеряют массу (M_B) и температуру ртути.

Рассчитывают объем *(V)* компактного слоя порошка по формуле:

$$V = \frac{M_A - M_B}{r_{Hg}}, \qquad (3)$$

где:

$M_A - M_B$ - разница количества ртути, г;

ρ_{Hg} - плотность ртути при данной температуре, г/мл.

Повторяют измерения дважды, меняя порцию порошка. Колебания объема испытуемого порошка не должны составлять более 0,01 мл. Используют среднее значение.

Константу аппарата К определяют с помощью порошка с известной удельной площадью поверхности.

Рассчитывают необходимое количество стандарта испытуемого порошка по формуле 1. Используют известную плотность и объем компактного слоя порошка (формула 3). Гомогенизируют и разрыхляют порошок, встряхивая его в течение 2 мин в контейнере вместимостью 100 мл. Готовят компактный слой порошка и замеряют время, необходимое для опускания столбика жидкости со второй до

третьей метки (как описано ранее). Константу аппарата К рассчитывают по формуле:

$$K = \frac{S_{sp} \cdot r \cdot (1-e) \cdot \sqrt{h}}{\sqrt{e^3} \cdot \sqrt{t}} \qquad (4)$$

S_{sp} - известная удельная площадь поверхности стандарта испытуемого порошка;

ρ - плотность испытуемого вещества, г/мл;

e - пористость компактного слоя порошка;

t - время, необходимое для опускания столбика жидкости со второй до третьей метки, с;

η - динамическая вязкость воздуха, мПа/с (см. Таблицу 2.9.14.-1).

Плотность ртути и вязкость воздуха при разных температурах представлены в Таблице 2.9.14.-1.

Таблица 2.9.14.-1

Температура (°C)	**Плотность ртути (г/мл)**	**Вязкость воздуха (η) (мПа/с)**	$\sqrt{\eta}$
16	13,56	0,01800	0,1342
17	13,56	0,01805	0,1344
18	13,55	0,01810	0,1345
19	13,55	0,01815	0,1347
20	13,55	0,01819	0,1349
21	13,54	0,01824	0,1351
22	13,54	0,01829	0,1353
23	13,54	0,01834	0,1354
24	13,54	0,01839	0,1356

2.9.15. НАСЫПНОЙ ОБЪЕМ

Испытание позволяет определить при заданных условиях насыпной объем и насыпную плотность материала, состоящего из твердых частиц (например, порошков, гранул), до усадки, способность материала к усадке, а также его объем и плотность после усадки.

Оборудование. Прибор (см. Рисунок 2.9.15.-1) состоит из следующих частей:

- аппарата для уплотнения, производящего за 1 мин 250±15 ударов по столбику с высоты 3±0,2 мм; подставки для градуированного цилиндра с держателем массой 450±5 г.

- градуированного цилиндра объемом 250 мл (с делением 2 мл) и массой 220±40 г.

Допускается использование других приборов.

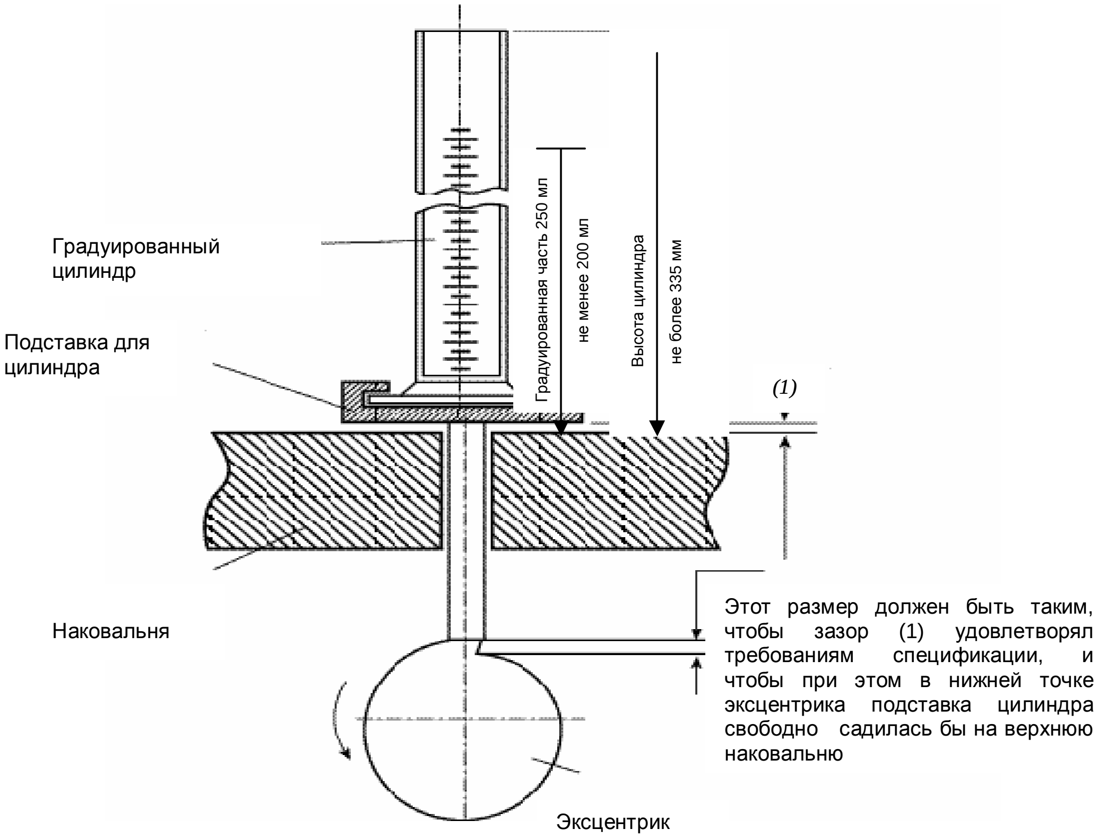


Рисунок 2.9.15.-1

МЕТОДИКА

В сухой цилиндр помещают без уплотнения 100,0 г (m - масса навески, в граммах) испытуемого вещества. Если это невозможно, берут навеску испытуемого вещества с заданным насыпным объемом от 50 мл до 250 мл и эту массу указывают в результате. Закрепляют цилиндр в держателе. Фиксируют насыпной объем до уплотнения V_0 в миллилитрах. Выполняют 10, 500 и 1250 ударов и фиксируют соответствующие объемы V_{10}, V_{500} и V_{1250} в миллилитрах после уплотнения. Если разница между объемами V_{500} и V_{1250} превышает 2 мл, выполняют еще 1250 ударов.

ПРЕДСТАВЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

a) Объемы:

- насыпной объем – объем до усадки: $V_{0,}$ мл;
- объем после усадки: $V_{1250,}$ мл или V_{2500}, мл.

b) Способность к усадке: разность объемов $V_{10,}$ мл - V_{500}, мл.

c) Плотность:

- насыпная плотность – плотность до усадки: *m/V₀*, г/мл;
- насыпная плотность после усадки: m/V_{1250}, г/мл или m/V_{2500}, г/мл.

2.9.16. СЫПУЧЕСТЬ

Испытание на сыпучесть предназначено для определения способности материала, состоящего из твердых частиц (например, порошков и гранул) течь в вертикальном направлении при заданных условиях.

Оборудование. В зависимости от сыпучести испытуемого материала используют воронки с выходным стволом или без выходного ствола, с разными углами и диаметрами выходных отверстий. Типовые воронки показаны на Рисунках 2.9.16.-1 и 2.9.16.-2. Воронка поддерживается в вертикальном положении при помощи специального приспособления. Вся конструкция должна быть защищен от вибрации (метод неподвижной воронки).

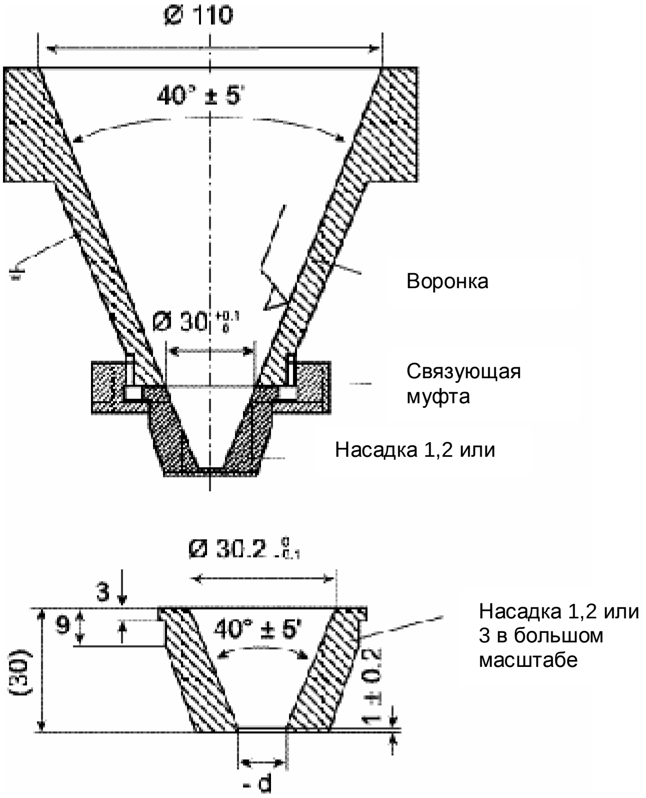


Рисунок 2.9.16.-1. Воронка и насадка.
Насадку изготавливают из нержавеющей кислотоупорной стали (*V4A, CrNi*)
Размеры указаны в миллиметрах

Насадка	**Диаметр *(d)* выходного отверстия (мм)**
1	10 ± 0,01
2	15 ± 0,01
3	25 ± 0,01

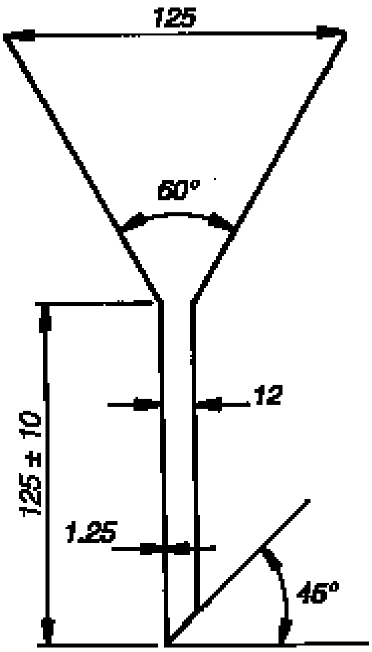


Рисунок 2.9.16.-2
Размеры указаны в миллиметрах

МЕТОДИКА

В сухую воронку, выходное отверстие которой закрыто подходящим способом, помещают без уплотнения навеску испытуемого вещества, взвешенную с точностью до 0,005 г. Количество испытуемого вещества зависит от его насыпного объема и от типа использованного прибора. Открывают выходное отверстие воронки и определяют время, необходимое для истечения испытуемого вещества из воронки. Проводят три измерения.

ПРЕДСТАВЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Сыпучесть выражают в секундах и десятых долях секунд, отнесенных к 100 г образца.

Результаты зависят от условий хранения испытуемого вещества.

Результаты могут быть представлены следующим образом:

а) как среднее значение полученных результатов, при условии, что ни один из трех результатов не отклоняется от среднего значения более чем на 10%;

b) в виде диапазона значений, если отдельные результаты отклоняется от среднего значения более, чем на 10%;

c) в виде графика зависимости массы от времени истечения;

d) указывают бесконечное время, если образец полностью не вытек через воронку.

Оборудование. Допускается проводить определение сыпучести с использованием воронки с виброустройством (Рисунок 2.9.16.-3), обеспечивающим амплитуду колебаний от 0,04 мм до 0,1 мм при частоте 50 Гц. Конструкция должна обеспечивать устойчивость прибора при вибрации (метод воронки с виброустройством).

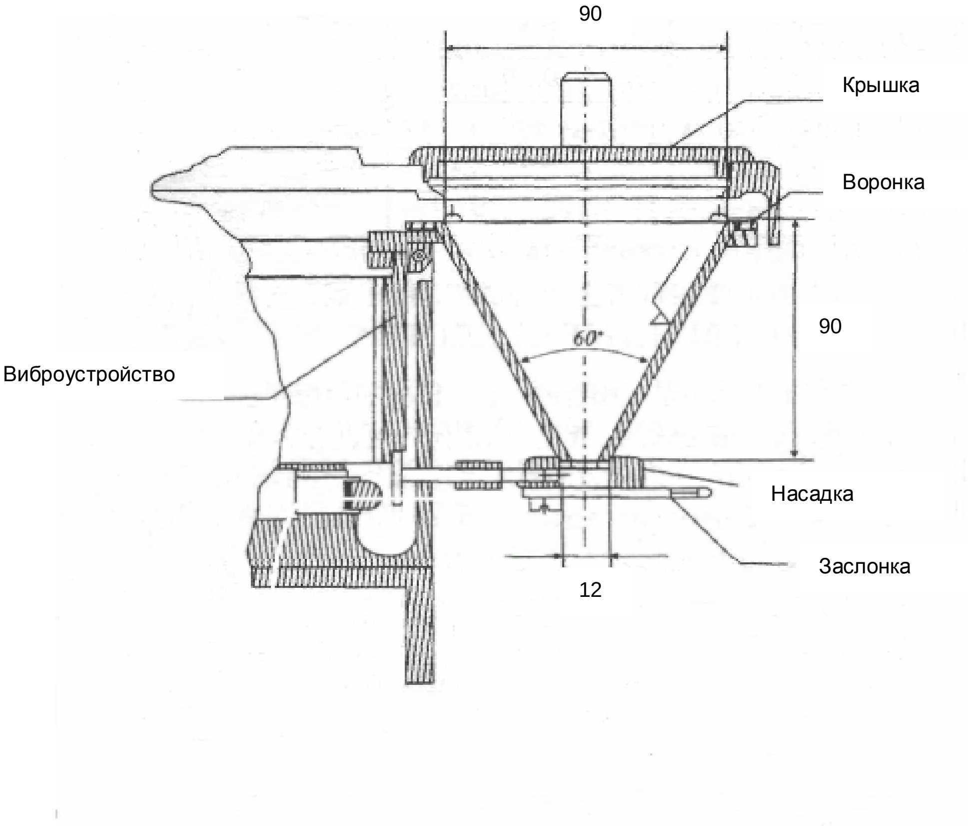


Рисунок 2.9.16.-3. – Воронка и насадка
Размеры указаны в миллиметрах

МЕТОДИКА

В сухую воронку, выходное отверстие которой закрыто заслонкой, помещают без уплотнения навеску испытуемого вещества массой 50 г, взвешенную с точностью до 0,01 г. Включают виброустройство и через 20 с открывают заслонку. Определяют время, необходимое для полного истечения испытуемого вещества из воронки. Проводят три измерения.

ПРЕДСТАВЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Сыпучесть (V_c) рассчитывают по формуле:

$$V_c = \frac{m}{t},$$

где:

m – масса навески испытуемого вещества, г;

t – время истечения испытуемого вещества из воронки, с.

Результаты представляют, как указано для метода неподвижной воронки. Необходимо в частной статье указывать метод и размер отверстия воронки, используемой при определении сыпучести.

2.9.17. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИЗВЛЕКАЕМОГО ОБЪЕМА ПАРЕНТЕРАЛЬНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Инъекционные лекарственные средства могут выпускаться в однодозовых контейнерах как ампулы, картриджы или предварительно заполненные шприцы, объем которых должен быть достаточным для гарантированного извлечения номинального объема, указанного на этикетке.

Соответствие требованиям к извлекаемому объему гарантировано наполнением объема большего, чем номинальный объем. Величина избыточного объема зависит от характеристик лекарственного средства. Однодозовые контейнеры не имеют четких требований по превышению номинального объема, но этот объем не должен превышать номинальный настолько, чтобы представлять опасность при введении всего содержимого контейнера.

Суспензии и эмульсии необходимо встряхивать перед извлечением содержимого и перед определением его плотности. Масляные и вязкие лекарственные средства при необходимости предварительно нагревают, следуя указаниям на этикетке, и встряхивают перед извлечением содержимого. Перед измерением объема содержимое охлаждают до температуры 25°С.

ОДНОДОЗОВЫЕ КОНТЕЙНЕРЫ

Если номинальный объем более 10 мл, испытывают один контейнер, если номинальный объем составляет от 3 мл до 10 мл, испытывают три контейнера, если номинальный объем составляет менее 3 мл, испытывают пять контейнеров. Содержимое каждого контейнера извлекают с помощью сухих шприцев для подкожного введения вместимостью не более, чем тройной измеряемый объем, имеющих иглу 21 калибра, длиной не менее 2,5 см.

Вытесняют пузырьки воздуха из шприца и иглы, содержимое переливают в специальный сухой градуированный цилиндр, избегая опорожнения иглы. Вместимость цилиндра должна быть достаточной, чтобы измеряемый объем составлял не менее 40% градуированной части цилиндра. Другим способом объем содержимого в миллилитрах можно рассчитать путем деления массы испытуемого лекарственного средства (г) на плотность.

Содержимое 2 или 3 контейнеров, имеющих номинальный объем 2 мл и менее, может быть объединено при выполнении измерений. При этом для извлечения содержимого каждого контейнера следует использовать отдельный сухой шприц. Для контейнеров, содержимое которых имеет объем 10 мл и более, допускается переливание лекарственного средства непосредственно в цилиндр или мерный стакан.

Полученный объем не должен быть меньше номинального объема. Для контейнеров с объемом 2 мл и менее полученный объем должен быть не менее суммы объединенных номинальных объемов.

МНОГОДОЗОВЫЕ КОНТЕЙНЕРЫ

Для лекарственных средств, предназначенных для инъекционного введения, на этикетке обязательно указывают количество доз определенного объема. Выбирают один контейнер и проводят испытание, как для однодозовых контейнеров, используя столько шприцев, сколько доз лекарственного средства указано на контейнере. Вместимость шприцев должна быть не менее дозы, указанной на этикетке.

КАТРИДЖЫ И ПРЕДВАРИТЕЛЬНО НАПОЛНЕННЫЕ ШПРИЦЫ

Если номинальный объем превышает 10 мл, испытывают один контейнер, если номинальный объем составляет от 3 мл до 10 мл, испытывают три контейнера, если номинальный объем составляет 3 мл и менее, испытывают пять контейнеров. При необходимости, к контейнеру присоединяют принадлежности (иглу, поршень, шприц) и переносят все содержимое, избегая опорожнения иглы, в сухую тарированную мензурку путем медленного и постоянного давления на поршень. Взвешивают и определяют массу содержимого. Извлекаемый объем рассчитывают путем деления массы содержимого каждого контейнера на плотность лекарственного средства.

Рассчитанный объем для каждого измерения должен быть не меньше номинального объема.

ИНФУЗИИ ДЛЯ ПАРЕНТЕРАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ

Отбирают один контейнер. Содержимое переносят в сухой мерный цилиндр такой вместимости, чтобы определяемый объем заполнил не менее 40% номинального объема цилиндра. Измеряют извлекаемый объем.

Полученный объем должен быть не меньше номинального объема, указанного на контейнере.

Каждый контейнер для инъекционных лекарственных средств наполняют объемом, превышающим номинальный. Избыточный объем рекомендован в Таблице 2.9.17.-1.

Таблица 2.9.17.-1

Номинальный объем, мл	**Избыточный объем, мл**	
	Для подвижных жидкостей	**Для вязких жидкостей**
0,1	0,10	0,12
1,0	0,10	0,15
2,0	0,15	0,25
5,0	0,30	0,50
10,0	0,50	0,70
20,0	0,60	0,90
30,0	0,80	1,20
50,0 и более	2 %	3 %

2.9.18. ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА ДЛЯ ИНГАЛИЦИЙ: АЭРОДИНАМИЧЕСКОЕ ИСПЫТАНИЕ МЕЛКИХ ЧАСТИЦ

Испытание предназначено для определения характеристик мелких частиц облаков аэрозолей, образующихся при использовании лекарственных средств для ингаляций.

Для испытания используют один из описанных ниже приборов по указанной методике, если нет других указаний в частных статьях.

ПРИБОР (А) (СТЕКЛЯННЫЙ ИМПИНДЖЕР)

Прибор изображен на Рисунке 2.9.18.-1 (см. также Таблицу 2.9.18.-1).

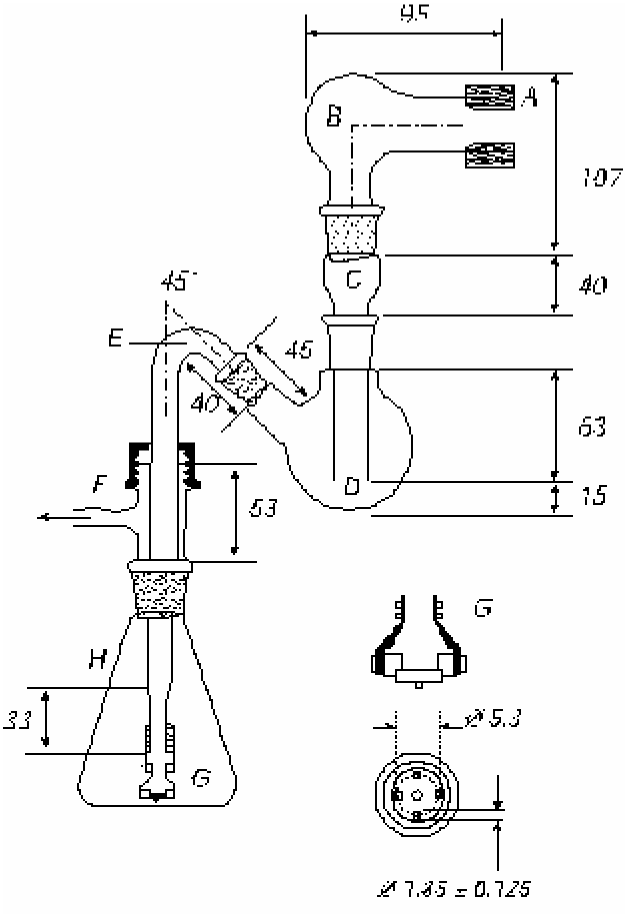


Рисунок 2.9.18.-1. – Прибор для аэродинамического испытания мелких частиц. *Размеры в миллиметрах (допустимые отклонения ±1 мм, если нет других указаний)*

Таблица 2.9.18.-1

Спецификации компонентов для Рисунка 2.9.18.-1.

Код	**Компонент**	**Описание**	**Размеры***
A	Адаптер мундштука	Формованный резиновый адаптер для привода мундштука	
B	Горловина	Видоизмененная круглодонная колба *входное отверстие из матового стекла* *воронка выпускного отверстия из матового стекла*	50 мл 29/32 24/29
C	Горловина	Видоизмененный стеклянный адаптер *входное отверстие из матового стекла;* *воронка выпускного отверстия из матового стекла;* нижняя часть выпускного отверстия в виде трубки определенного диаметра *диаметр трубки* Отдельная тонкостенная трубка определенного диаметра *наружный диаметр*	 24/29 24/29 14 17

D	Верхняя ударная каме	Видоизмененная круглодонная колба *входное отверстие из матового стекла* *воронка выпускного отверстия из матового стекла*	100 мл 24/29 24/29
E	Соединяющая трубка	Стеклянная трубка со стенками средней толщины *воронка из матового стекла* Согнутая часть и верхняя вертикальная часть *наружный диаметр* Нижняя вертикальная часть *наружный диаметр*	 14/23 13 8
F	Резьба винта бокового адаптера	Пластмассовый наконечник винта Силиконовый резиновый круг PTFE шайба Стеклянная резьба винта, размер Выпускное отверстие вакуумного насоса *минимальный диаметр*	28/13 28/11 28/11 28 5
G	Нижняя форсунка	Модифицированный полипропиленовый держатель для фильтра, соединенный с нижней вертикальной частью соединительной трубки с помощью PTFE шайбы Ацетальный циркулярный диск, имеющий в центре четыре форсунки, расположенных в диаметре 5,3 мм от общей форсункой *диаметр форсунки* *выступ форсунки*	см. Прибор 2.9.18.-1 10 2 2
H	Нижняя ударная камера	Коническая колба *входное отверстие из матового стекла*	250 мл 24/29
* Размеры указаны в миллиметрах, если нет других указаний в частных статьях.			

Методика для распылителей

Помещают 7 мл и 30 мл растворителя, указанного в частной статье, в верхнюю и нижнюю ударные камеры, соответственно.

Соединяют все части, расположив прибор вертикально. Форсунка в нижней части аппарата должна касаться только дна нижней ударной камеры. Присоединяют насос с фильтром (с определенным размером пор) к выходному отверстию аппарата и пропускают через аппарат воздух. Скорость воздуха на входе в горловину регулируют 60±5 л/мин.

Вводят жидкое испытуемое лекарственное средство для ингаляций в резервуар распылителя. Надевают наконечник и соединяют с помощью адаптера с прибором.

Включают насос аппарата, а через 10 с - распылитель. Через 60 с, если нет других указаний в частной статье, отключают распылитель, и через 5 с после этого выключают насос. Демонтируют прибор и промывают внутреннюю поверхность верхней ударной камеры растворителем, указанным в частной статье. Промывную жидкость собирают в мерную колбу. Затем промывают внутреннюю поверхность нижней ударной камеры. Промывную жидкость собирают в другую мерную колбу. Промывают фильтр насоса и его соединение с нижней ударной камерой, промывную жидкость объединяют с промывной

жидкостью, полученной при мытье нижней ударной камеры. Определяют количественное содержание действующего вещества в каждой из двух колб аналитическим методом, описанным в частной статье.

Результаты выражают для каждой части прибора в процентах по отношению к общему количеству действующего вещества.

Методика для ингаляторов под давлением

Адаптер мундштука помещают в конец горловины таким образом, чтобы наконечник мундштука при опускании его на глубину около 10 мм располагался выше горизонтальной оси горловины, а открытый конец мундштука, который соединен с контейнером под давлением, располагался выше остальных частей прибора.

Помещают 7 мл и 30 мл растворителя, указанного в частной статье, в верхнюю и нижнюю ударную камеры, соответственно.

Соединяют все части, расположив прибор вертикально. Форсунка в нижней части аппарата должна касаться только дна нижней ударной камеры. Присоединяют насос к выходному отверстию прибора и пропускают через аппарат воздух. Скорость воздуха на входе в горловину регулируют 60±5 л/мин.

Встряхивают в течение 5 с и, нажимая на дозирующий клапан, выпускают содержимое в воздух. Процедуру повторяют три раза, встряхивая каждый раз перед опорожнением в течение 5 с.

Встряхивают в течение 5 с, подключают насос к прибору, соединяют наконечник мундштука с адаптером и быстро нажимают на дозирующий клапан, опорожняя дозу лекарственного средства. Отсоединяют ингалятор от адаптера, встряхивают в течение 5 с, перемещают наконечник мундштука в адаптере и опять нажимают на дозирующий клапан. Повторяют описанную выше процедуру восемь раз, встряхивая каждый раз перед нажатием. После десятого нажатия ожидают 5 с и отсоединяют насос. Демонтируют прибор. Промывают внутреннюю и внешнюю поверхность входной трубки нижней ударной камеры растворителем, указанным в частной статье. Промывную жидкость собирают в нижней ударной камере. Определяют количественное содержание действующего вещества в полученном растворе аналитическим методом, описанным в частной статье. Результаты выражают в процентах по отношению к общему количеству действующего вещества, указанного на этикетке.

Методика для порошковых ингаляторов

Помещают 7 мл и 30 мл растворителя, указанного в частной статье, в верхнюю и нижнюю ударную камеры, соответственно.

Соединяют все части, расположив прибор вертикально. Форсунка в нижней части аппарата должна касаться только дна нижней ударной камеры. Без ингалятора на месте присоединяют насос к выходному отверстию прибора и пропускают через прибор воздух. Скорость воздуха на входе в горловину регулируют 60±5 л/мин.

Ингалятор готовят к использованию и вставляют через адаптер наконечник в прибор. Включают насос на 5 секунд. Выключают насос и достают ингалятор. Повторяют описанную процедуру девять раз. Демонтируют прибор. Промывают внутреннюю и внешнюю поверхность входной трубки нижней ударной камеры растворителем, указанным в частной статье. Промывную жидкость собирают в нижней ударной камере. Определяют количественное содержание действующего вещества в полученном растворе аналитическим методом, описанным в частной статье. Результаты выражают в процентах по отношению к общему количеству действующего вещества, указанного на этикетке.

АППАРАТ B (МЕТАЛЛИЧЕСКИЙ ИМПИНДЖЕР)

Аппарат представлен на Рисунках 2.9.18.-2/3.

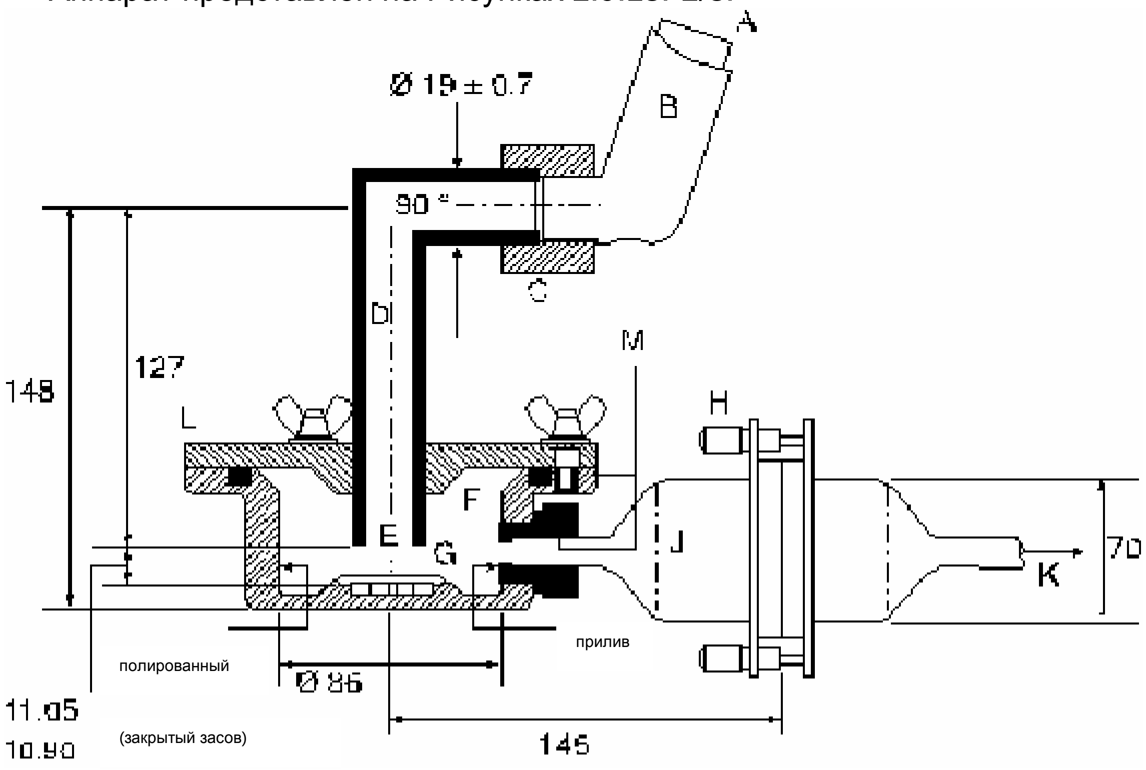


Рисунок 2.9.18.-2. – Аппарат B для аэродинамического испытания мелких частиц.
Размеры указаны в миллиметрах.

A. Ингаляционный контейнер под давлением
B. Мундштук
C. Адаптер
D. Горловина
E. Форсунка
F. Ударная камера
G. Диск из плавленного стекла (пористость №1)
H. Зажим для фильтра из нержавеющей стали
J. Стеклянный фильтр
K. Вакуумный насос
L. Алюминиевая крышка ударной камеры
M. Резиновые уплотнительные кольца

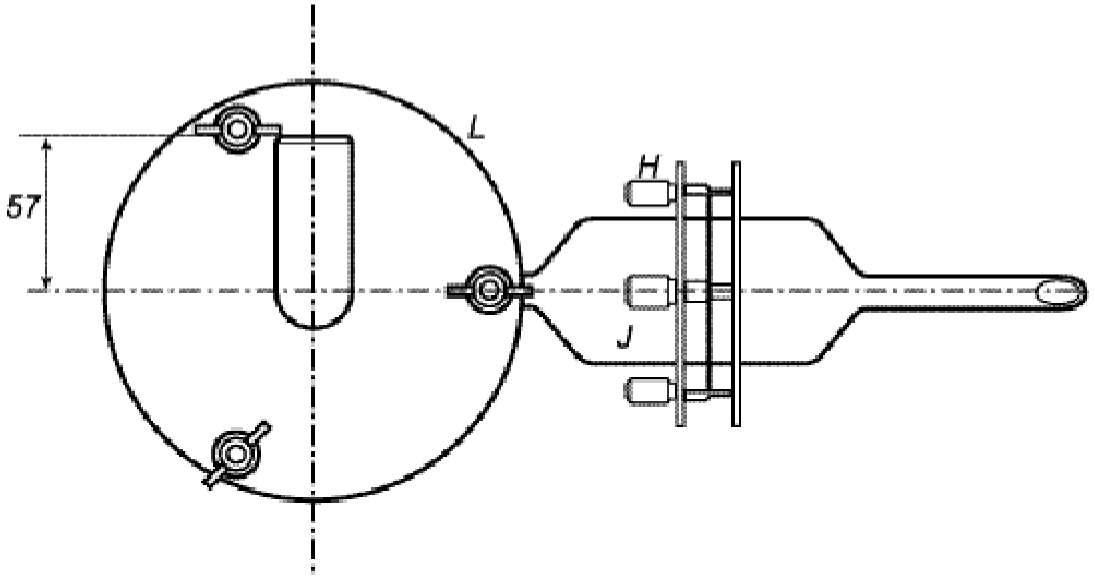


Рисунок 2.9.18.-3. – Аппарат В для аэродинамического испытания мелких частиц (вид сверху).

Размеры указаны в миллиметрах.

Методика для распылителей

Депонирование образуемых капель испытывают с помощью ударного прибора, который соединен с заполненным распылителем через соответствующий адаптер. Выходное отверстие прибора оснащено соответствующим фильтром (например, с размером пор 0,25 мкм). В этой методике используют сухую ударную камеру. Соединяют все составляющие части, таким образом, чтобы основание ударной камеры располагалось горизонтально. Присоединяют насос к выходному отверстию прибора и пропускают через прибор воздух. Скорость воздуха на входе в горловину устанавливают 60±5 л/мин.

Помещают жидкое лекарственное средство для ингаляций в резервуар распылителя. Присоединяют наконечник к адаптеру прибора. Включают насос аппарата и через 10 с включают распылитель. Через 60 с, если нет других указаний в частных статьях, выключают распылитель. Ожидают 5 с и затем выключают насос. Демонтируют прибор. Промывают внутреннюю поверхность горловины, верхнюю и нижнюю части камеры растворителем, указанным в частной статье. Промывную жидкость собирают в мерную колбу. Промывают сборку фильтра, пропуская растворитель через фильтр. Промывную жидкость собирают в другую мерную колбу. Определяют количество действующего вещества в полученных растворах аналитическим методом, описанным в частной статье. Результаты выражают для каждой части прибора в процентах по отношению к общему количеству действующего вещества.

Методика для ингаляторов под давлением

Адаптер мундштука помещают в конец горловины таким образом, чтобы наконечник мундштука при его опускании располагался выше горизонтальной оси горловины, а открытый конец мундштука, который соединен с контейнером под давлением, располагается выше остальных частей прибора.

В этой методике используют сухую ударную камеру. Соединяют все составляющие части таким образом, чтобы основание ударной камеры располагалось горизонтально, а контейнер под давлением располагался вертикально. Соединяют насос с выходным отверстием прибора и пропускают

через прибор воздух. Скорость воздуха на входе в горловину регулируют 60±5 л/ мин.

Встряхивают в течение 5 с и, нажимая на дозирующий клапан, выпускают содержимое в воздух. Процедуру повторяют три раза, встряхивая каждый раз перед опорожнением в течение 5 с.

Встряхивают в течение 5 с, подключают насос к прибору, соединяют наконечник мундштука с адаптером и быстро нажимают на дозирующий клапан, опорожняя дозу лекарственного средства. Отсоединяют ингалятор от адаптера, встряхивают в течение 5 с, надевают наконечник и соединяют с помощью адаптера с прибором и сразу нажимают для опорожнения.

Повторяют описанную выше процедуру восемь раз, встряхивая каждый раз перед нажатием. После десятого нажатия ожидают 5 с и отсоединяют насос. Демонтируют прибор.

Промывают сборку фильтра, пропуская растворитель, указанный в частной статье, через фильтр. Определяют количественное содержание действующего вещества в полученном растворе аналитическим методом, описанным в частной статье. Результаты выражают в процентах по отношению к общему количеству действующего вещества, указанного на этикетке.

Методика для порошковых ингаляторов

Помещают 25 мл растворителя, указанного в частной статье, в ударную камеру, чтобы покрылся диск из плавленого стекла.

Соединяют все составляющие части таким образом, чтобы основание ударной камеры располагалось горизонтально. Без ингалятора соединяют насос с выходным отверстием прибора и пропускают через аппарат воздух. Скорость воздуха на входе в горловину регулируют 60±5 л/мин.

Ингалятор готовят к применению и вставляют наконечник через адаптер в прибор. Включают насос на 5 с. Выключают насос и достают ингалятор. Повторяют описанную процедуру девять раз. Демонтируют прибор.

Промывают сборку фильтра, пропуская растворитель, указанный в частной статье, через фильтр. Определяют количественное содержание действующего вещества в полученном растворе аналитическим методом, указанным в частной статье. Вычисляют количество действующего вещества, собранного на фильтре и результаты выражают в процентах по отношению к общему количеству действующего вещества, указанного на этикетке.

Таблица 2.9.18.-2

Спецификации компонентов для Рисунков 2.9.18.-4/6.

Код*	**Компонент**	**Описание**	**Размеры****
A,H	Трубка форсунки	Металлическая трубка с резьбой, заполненная уплотнителем (С), с гладкой внутренней поверхностью	См. Рисунок 2.9.18.-5
B,G	Разделительная стенка	Круглая металлическая пластинка - толщина - диаметр	120 См. Рисунок 2.9.18.-5
C	Наполнитель	Например, PTFE	Для наполнения трубки форсунки
D	Ударная пластинка	Пористость диска из спекшегося стекла, диаметр	См. Рисунок 2.9.18.-5

E	Стеклянный цилиндр	Гладкая стеклянная пробирка - высота, вместе с наполнителем - наружный диаметр - толщина стенки - порт образца (F) диаметр - крышка для порта образца	 46 100 3,5 18 ISO 24/25
J	Металлический каркас	L-образный круглый каркас с щелью - внутренний диаметр - высота - толщина в горизонтальной плоскости - толщина в вертикальной плоскости	Для присоединения ударной пластинки 4 0,5 2
K	Провод	Стальной провод для внутреннего крепления каркаса и муфты (по два для каждого) - диаметр	 1
L	Муфта	Металлическая муфта, закрепленная на трубке форсунки резьбой - внутренний диаметр - высота - толщина	Для крепления трубки форсунки 6 5
M	Наполнитель	Например, силикон	Для наполнения стеклянного цилиндра
N	Винт	Металлический винт с гайкой (шесть пар) - длина - диаметр	 205 4
P	Уплотнительное кольцо	Резиновое уплотнительное кольцо, диаметр × толщина	66,34 × 2,62
Q	Уплотнительное кольцо	Резиновое уплотнительное кольцо, диаметр × толщина	29,1 × 1,6
R	Держатель фильтра	Металлический кожух со станиной и выходным отверстием	См. Рисунок 2.9.18.-6
S	Держатель фильтра	Перфорированный металлический лист - диаметр - диаметр отверстий - расстояние между отверстиями	 65 3 4
T	Защелка-захват		
U	Трубки форсунок	Трубка форсунки (H)	См. приложения к Рисунку 2.9.18.-5

* Ссылки на Рисунки 2.9.18.—4.

** Измерено в миллиметрах с допустимыми отклонениями в соответствии с ISO 2768-m, если нет других указаний в частных статьях.

Дозирование и распределение мелких частиц

АППАРАТ С – МНОГОСТУПЕНЧАТЫЙ ЖИДКОСТНОЙ ИМПИНДЖЕР

Многоступенчатый жидкостной импинджер состоит из сжимающих ступеней 1 (пре-сепаратор), 2, 3 и 4 и основной ступени фильтра (5) (см. Рисунки 2.9.18.-4/6). Сжимающая ступень состоит из верхней горизонтальной металлической перегородки (B), через которую выступает входное отверстие трубки (A) со сжимающей пластинкой (D), стеклянного цилиндра (E) с отверстием для отбора проб (F), образующего вертикальную стенку ступени, и нижней горизонтальной металлической перегородки (G), через которую трубка (H) соединяется со следующей ступенью. Трубка 4 ступени (U) завершает многоступенчатую конструкцию. Сжимающая пластинка (D) крепится на металлической раме (J), которая соединена двумя проволоками (К) к втулке (L), соединенной с распылителем (C). Горизонтальная поверхность собирающей пластинки перпендикулярна оси распылителя и расположена по центру. Верхняя поверхность сжимающей пластинки немного приподнята над краем металлической рамы. Выемка по периметру горизонтальной стенки предназначена для стеклянного цилиндра. Стеклянные цилиндры напротив горизонтальных стенок закрыты сальником (M) и скреплены между собой шестью болтами (N). Отверстия для отбора проб закрыты пробками. Дно нижней стенки 4 ступени имеет концентрическое выпячивание с резиновым уплотнительным кольцом (P), которое вставлено напротив края фильтра, который вставлен в специальный держатель. Держатель фильтра (R) выполнен в виде резервуара с концентрическим углублением, в котором смонтирована перфорированная подпорка для фильтра (S). Держатель фильтра имеет размер, позволяющий вставлять фильтры диаметром 76 мм. Конструкция, включающая все ступени, зафиксирована на держателе фильтра двумя защелками (T). Правая отводная металлическая трубка входного отверстия (Рисунок 2.9.18.-7) соединена с первой ступенью импинджера. Резиновое уплотнительное кольцо распылителя обеспечивает герметичность соединения с входным отверстием. Для герметичного соединения ингалятора и входного отверстия используется специальный мундштук адаптера. Передняя поверхность наконечника ингалятора должна совпадать с передней поверхностью входного отверстия.

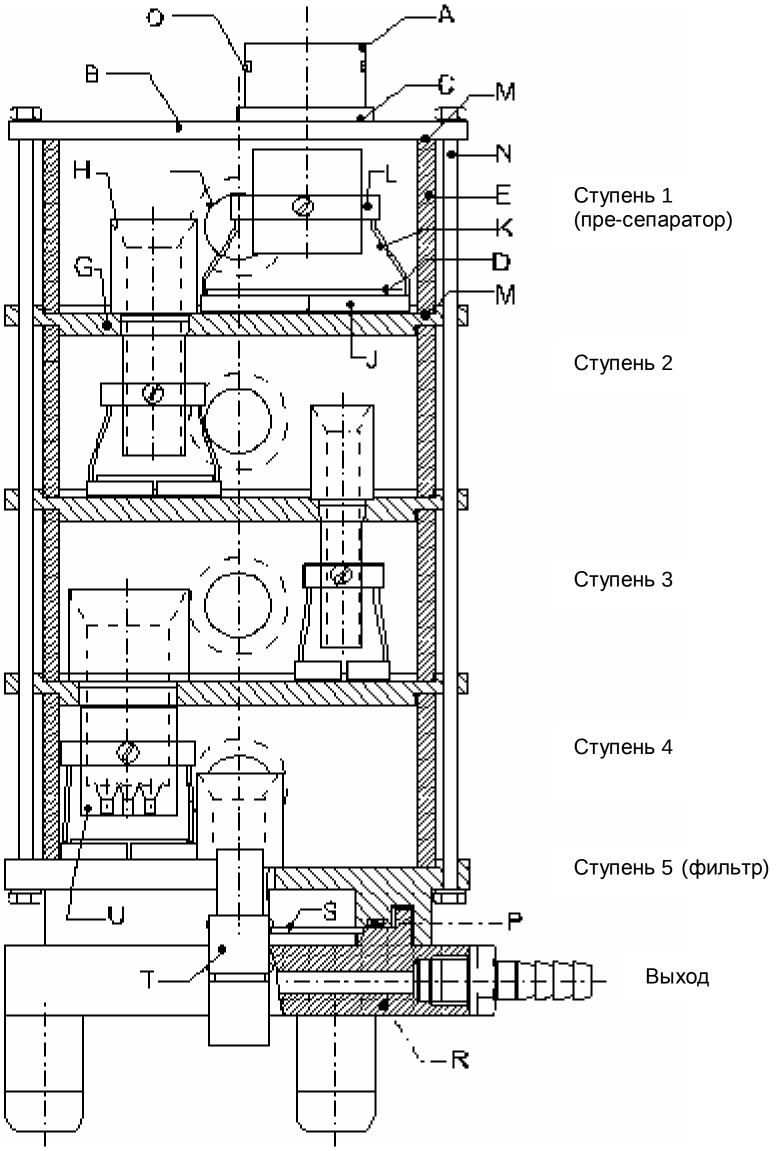


Рисунок 2.9.18.-4. – Многоступенчатый жидкостной импинджер

Таблица 2.9.18.-3

Размеры распылителя и сжимающей пластинки.

Тип	Код[2]	Ступень 1	Ступень 2	Ступень 3	Ступень 4	Фильтр (ступень 5)
Расстояние	1	9,5 (-,0+,5)	5,5 (-,0+,5)	4,0 (-,0+,5)	6,0 (-,0+,5)	н.о
Расстояние	2	26	31	33	30,5	0
Расстояние	3	8	5	5	5	5
Расстояние	4	3	3	3	3	н.о.
Расстояние	5	0	3	3	3	3
Расстояние	6 [3]	20	25	25	25	25
Расстояние	7	н.о.	н.о.	н.о.	8,5	н.о.
Диаметр	c	25	14	8,0(± ,1)	21	14
Диаметр	d	50	30	20	30	н.о.
Диаметр	e	27,9	16,5	10,5	23,9	н.о.
Диаметр	f	31,75 (-,0+,5)	22	14	31	22

Диаметр	g	25,4	21	13	30	21
Диаметр	h	н.о.	н.о.	н.о.	2,70 (± ,5)	н.о.
Диаметр	j	н.о.	н.о.	н.о.	6,3	н.о.
Диаметр	k	н.о.	н.о.	н.о.	12,6	н.о.
Радиус(4)	r	16	22	27	28,5	0
Радиус	s	46	46	46	46	н.о.
Радиус	t	н.о.	50	50	50	50
Угол	w	10°	53°	53°	53°	53°
Угол	u	н.о.	н.о.	н.о.	45°	н.о.
Угол	v	н.о.	н.о.	н.о.	60°	н.о.
(1) Измеряют в мм с допусками в соответствии ISO 2768-m, если нет других указаний в частных статьях						
(2) Ссылка на Рисунок 2.9.18.-5						
(3) Включая уплотняющее кольцо						
(4)Относительно центра перегородки ступени						
н.о. = не определяется						

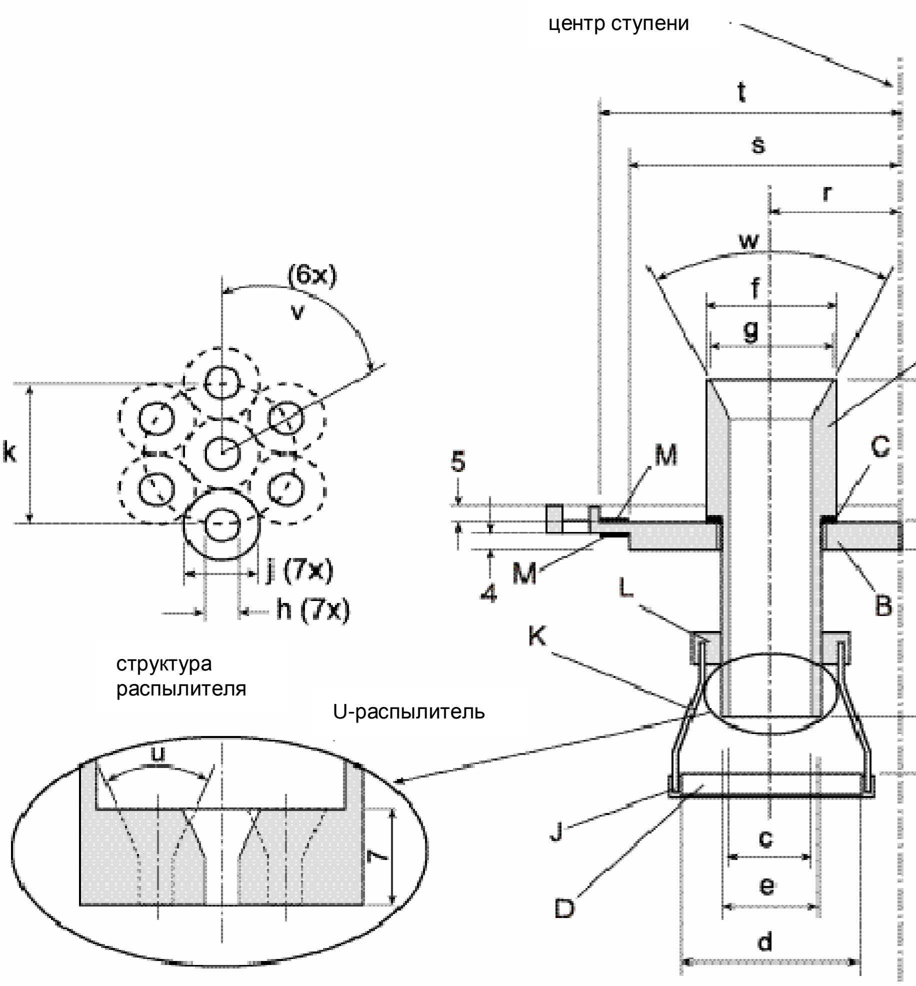


Рисунок 2.9.18.-5. – Подробная схема распылителя и сжимающей пластинки. *На вставках представлены концы распылителя U на ступени 4 (номера и строчные* буквы соответствуют обозначениям *Таблицы 2.9.18.-3; прописные буквы соответствуют обозначениям Рисунка 2.9.18.-4).*

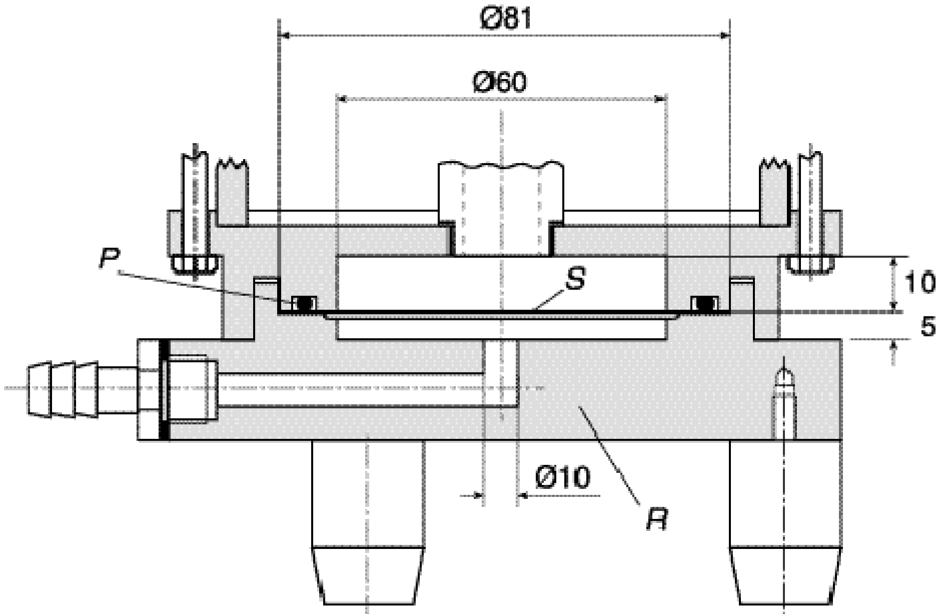


Рисунок 2.9.18.-6. – Подробная схема ступени фильтра (5 ступень)
Цифры обозначают размеры (Ø = диаметр). Прописным буквам соответствуют обозначениям в Таблице 2.9.18.-2.

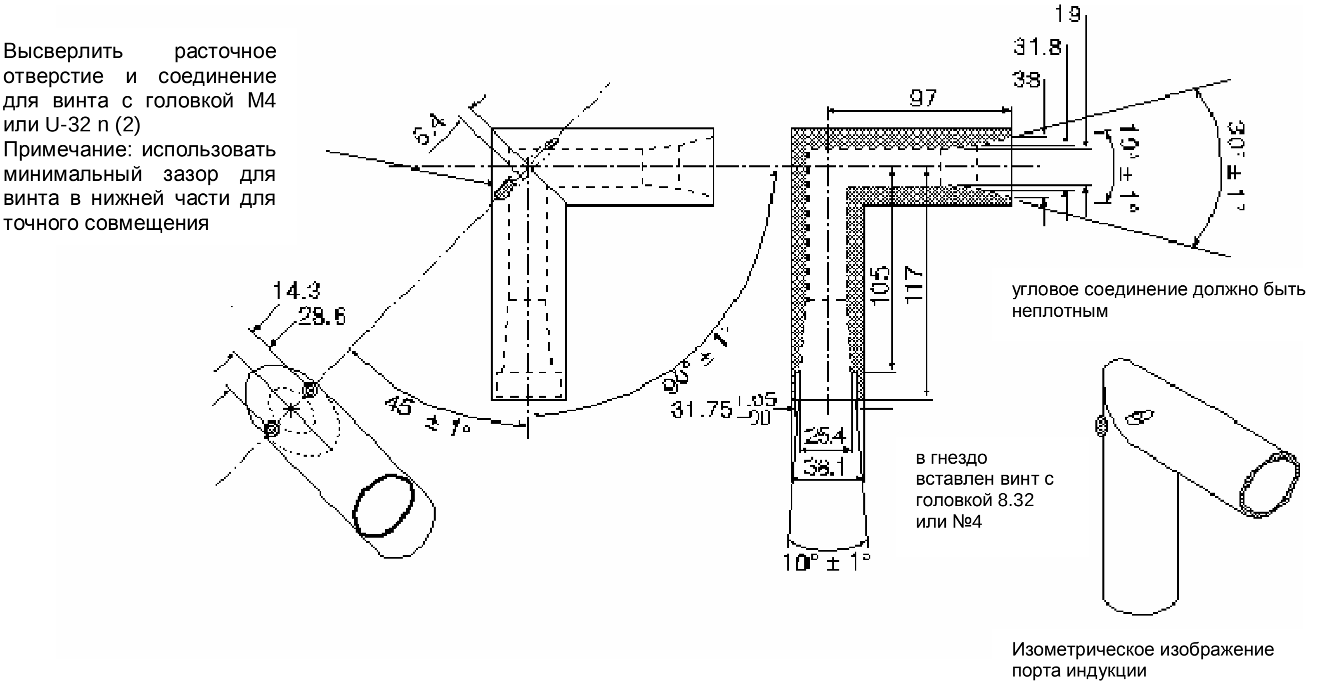


Рисунок 2.9.18.-7. – Распылитель
Размеры указаны в миллиметрах, если нет других указаний в частной статье.

Примечание:

(1) Можно использовать алюминиевую или стальную пластинку.

(2) Провести обработку стержневой заготовки 38 мм (1,5").

(3) Просверлить в стержне канал диаметром 19 мм.

(4) Разрез трубки точно под углом 45°, как показано.

(5) Внутренние отверстия и сужения должны быть гладкими – шлифовка приблизительно 0,40 мкм (16 мкм).

(6) Соединения выполняются таким образом, чтобы не было протекания.

(7) Установить зажимное приспособление для выравнивания канала диаметром 19 мм, а также для сверления и нарезания резьбы M4 x 0,7 или 8-32. Не должно быть несовпадений внутренних каналов в угловых соединениях.

Методика для дозированных лекарственных средств для ингаляций под давлением. 20 мл растворителя, указанного в частной статье, предназначенного для растворения действующего вещества, распределяют по ступеням 1-4 и закрывают пробками. Наклоняют аппарат, чтобы смочить пробки для нейтрализации электростатического заряда. Вставляют фильтр для сборки действующего вещества на 5 ступени и монтируют прибор. Соответствующий мундштук адаптера вставляют в конец входного отверстия таким образом, чтобы наконечник мундштука находился на одной линии с горизонтальной осью входного отверстия, а ингалятор был ориентирован в рабочую позицию. К входному отверстию прибора присоединяют вакуумный насос и регулируют поток воздуха через прибор со скоростью на входе 30±1,5 л/мин. Выключают поток воздуха.

Если нет других указаний в инструкции по применению, встряхивают ингалятор в течение 5 с и опорожняют одну дозу в воздух. Присоединяют насос к прибору, вставляют наконечник в адаптер и опорожняют ингалятор в прибор. Нажимают дозирующий клапан до полного опорожнения. Отсоединяют ингалятор от адаптера. Повторяют процедуру. Количество выпусков должно быть минимальное, как правило, не более десяти. Через 5 с после последнего опорожнения отключают насос.

Демонтируют ступень фильтра прибора. Аккуратно извлекают фильтр и смывают действующее вещество растворителем, указанным в частной статье. Отсоединяют входное отверстие и адаптер мундштука от прибора и смывают действующее вещество растворителем. При необходимости ополаскивают внутреннюю поверхность распылителя ступени 1 растворителем, позволяя растворителю течь. Смывают действующее вещество с внутренних стенок и помещают пластинки всех четырех верхних ступеней аппарата в раствор соответствующих ступеней, осторожно поворачивая прибор. Следят, чтобы жидкость не проникала из одной ступени в другую.

Используя аналитический метод, указанный в частной статье, определяют количество действующего вещества в каждом из шести собранных объемов растворителей.

Рассчитывают концентрацию мелких частиц по методике, приведенной ниже.

Методика для порошковых ингаляторов. Вставляют низко резистентный фильтр для собирания действующего вещества на ступени 5 и собирают прибор. Присоединяют прибор к системе регулирования потока в соответствии со схемой, представленной на Рисунке 2.9.18.-8. Если нет других указаний, выполняют испытание при скорости потока, Q (±5 %), как в испытании на определение однородности дозы, пропускают через прибор 4 литра воздуха.

Таблица 2.9.18.-4.

Спецификация компонентов для Рисунка 2.9.18.-8.

Код	Компонент	Описание
A	Соединитель	Внутренний диаметр ≥ 8 мм, например, короткое металлическое сцепление с отводом малого диаметра к P3.
B	Вакуумная трубка	8 ± 0,5 мм (внутренний диаметр) × 50 ±10 см (длина), например силиконовая трубка с наружным диаметром - 14 мм и внутренним диаметром - 8 мм.
C	Двусторонний электромагнитный клапан	Минимальная сопротивляемость воздуха в мундштуке при внутреннем диаметре ≥ 8 мм и при максимальном времени 100 мс (например, тип 256-A08, Bürkert GmbH, D-74653 Ingelfingen), или аналогичный
D	Вакуумный насос	Насос должен поддерживать необходимую скорость потока в собранном аппарате с порошковом ингалятором (например, продукт тип 1023, 1423 или 2565, Gast Manufacturing Inc., Benton Harbor, MI 49022) или аналогичный. Насос соединяют с электромагнитным клапаном с помощью короткой широкой с внутренним диаметром ≥ 10 мм вакуумной трубки и/или и соединителя.
E	Таймер	Таймер для электромагнитного клапана (например, тип G814, RS Components International, Corby, NN17 9RS, UK), или аналогичный.
P2 P3	Измерители давления	Измерения выполняются в условиях постоянного тока с трансдуктором абсолютного давления.
F	Клапан регулирования расхода	Регулируемый клапан, имеющий максимальное значение C_v ≥ 1, (например, тип 8FV12LNSS, Parker Hannifin plc., Barnstaple, EX31 1NP, UK), или аналогичный

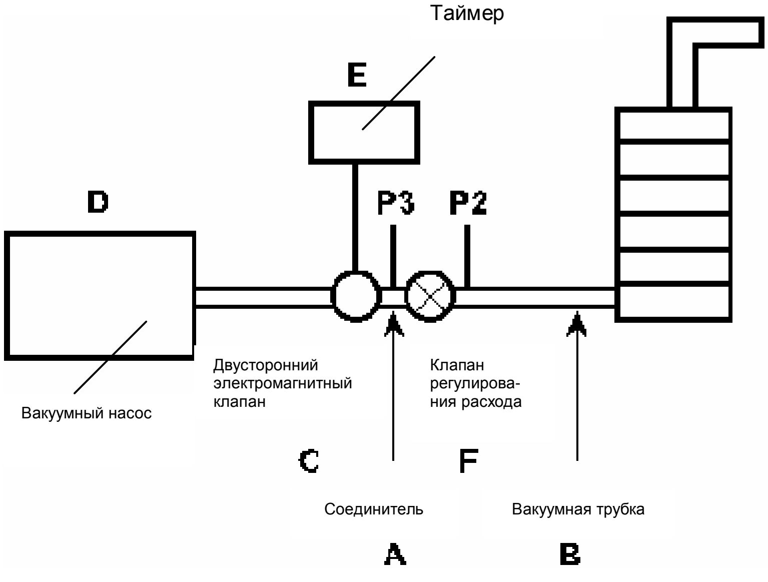


Рисунок 2.9.18.-8. – Экспериментальный прибор для испытания порошковых ингаляторов

Соединяют измеритель потока, откалиброванный для объемного измерения выходного потока и входное отверстие, оставляя метр. Клапан регулирования расхода настраивают на постоянную скорость потока, Q (±5%), через систему. Отключают поток.

Гарантируют, что критический поток контролируется в клапане регулирования потока во время проведения процедуры. Устанавливают ингалятор и при установленной испытательной скоростью потока измеряют абсолютное давление с обеих сторон контрольного клапана (давление в точках P2 и P3 на Рисунке 2.9.18.-8). Соотношение P3/P2 ≤ 0,5 свидетельствует о критическом потоке. В этом случае переключаются на более мощный насос и измеряют испытательную скорость потока, если критический поток не обозначен.

20 мл растворителя, указанного в частной статье, предназначенного для растворения действующего вещества, распределяют по четырем верхним ступеням прибора и закрывают пробками. Наклоняют аппарат, чтобы смочить пробки для нейтрализации электростатического заряда. Мундштук адаптера вставляют в конец выходного отверстия.

Готовят порошковый ингалятор в соответствии с инструкцией по применению. При работающем насосе и закрытом двустороннем клапане, вставляют наконечник в ингалятор через специальный мундштук адаптера. Высвобождают порошок в прибор, открывая клапан на необходимое время, T (± 5%). Повторяют процедуру. Количество высвобождений должно быть минимальным, как правило, не более десяти. Через 5 с после последнего высвобождения отключают насос.

Демонтируют ступень фильтра прибора. Аккуратно извлекают фильтр и смывают действующее вещество растворителем. Отсоединяют выходное отверстие и мундштук адаптера от прибора и смывают действующее вещество растворителем. При необходимости ополаскивают внутреннюю поверхность распылителя ступени 1 растворителем, позволяя растворителю течь в ступень. Смывают действующее вещество с внутренних стенок и помещают пластинки всех четырех верхних ступеней прибора в раствор соответствующей ступени, осторожно поворачивая аппарат. Следят, чтобы жидкость не проникала из одной ступени в другую.

Используя аналитический метод, указанный в частной статье, определяют количество действующего вещества в каждом из шести собранных объемов растворителей.

Рассчитывают концентрацию мелких частиц по формуле:

$$q_1 = \sqrt{(60 / Q)},$$

где:

Q – скорость потока, л/мин.

Таблица 2.9.18.-5

Расчеты для Аппарата C

Диаметр на разрезе (мкм)	**Масса действующего вещества высвобожденного при опорожнении**	**Общая масса действующего вещества высвобожденного при опорожнении**	**Общая фракция действующего вещества (%)**
$d_4 = 1{,}7 \cdot q_1$	масса на ступени 5, m_5*	$c_4 = m_5$	$f_4 = (c_4/c) \cdot 100$
$d_3 = 3{,}1 \cdot q_1$	масса на ступени 4, m_4	$c_3 = c_4 + m_4$	$f_3 = (c_3/c) \cdot 100$
$d_2 = 6{,}8 \cdot q_1$	масса на ступени 3, m_3	$c_2 = c_3 + m_3$	$f_2 = (c_2/c) \cdot 100$
	масса на ступени 2, m_2	$c = c_2 + m_2$	100

* ступень 5 - фильтр

АППАРАТ D – ПРОБООТБОРНИК «АНДЕРСЕН»

«Андерсен» 1 ACFM состоит из 8 алюминиевых ступеней и фильтра. Ступени соединены уплотнительными кольцами. В конфигурациях, используемых в ингаляторах под давлением (Рисунок 2.9.18.-9), входная часть пробоотборника соединена с прямоугольным металлическим коленом (Рисунок 2.9.18.-7). Для обеспечения герметичности соединения ингалятора и входного отверстия используют специальный мундштук адаптера. Передняя поверхность наконечника ингалятора должна совпадать с передней поверхностью входного отверстия. В конфигурациях, используемых в порошковых ингаляторах, пре-сепаратор располагается над верхней ступенью для сбора порошка, не попавшего в дыхательные пути. Он соединяется с входным отверстием (Рисунок 2.9.18.-10). Чтобы обеспечить быстрое прохождение потока через пробоотборник, выступающий сосок, который используется для соединения пробоотборника с вакуумной системой, удлиняется, и его внутренний диаметр составляет ≥ 8 мм.

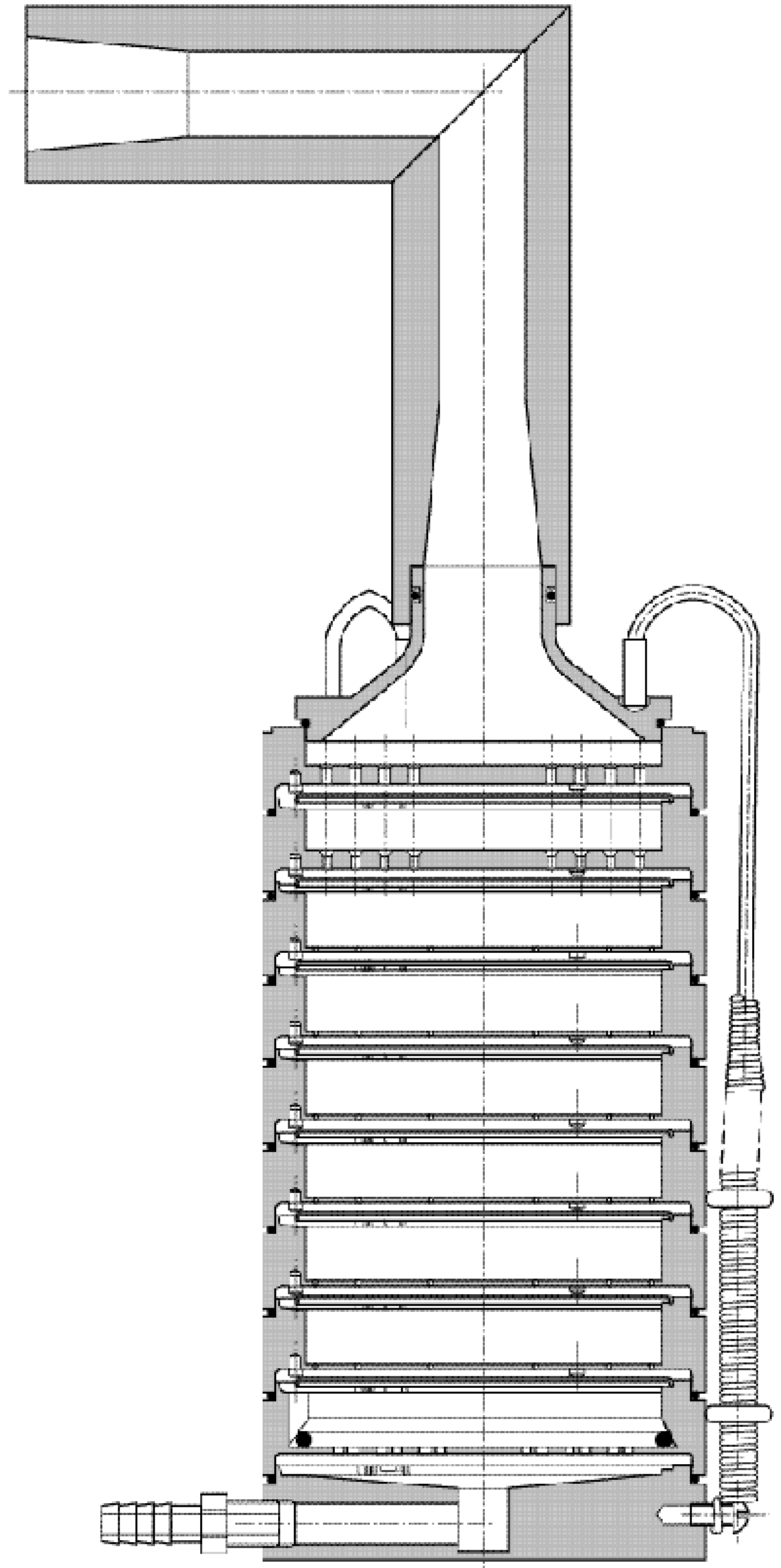


Рисунок 2.9.18.-9. – Пробоотборник «Андерсен» для ингаляторов под давлением

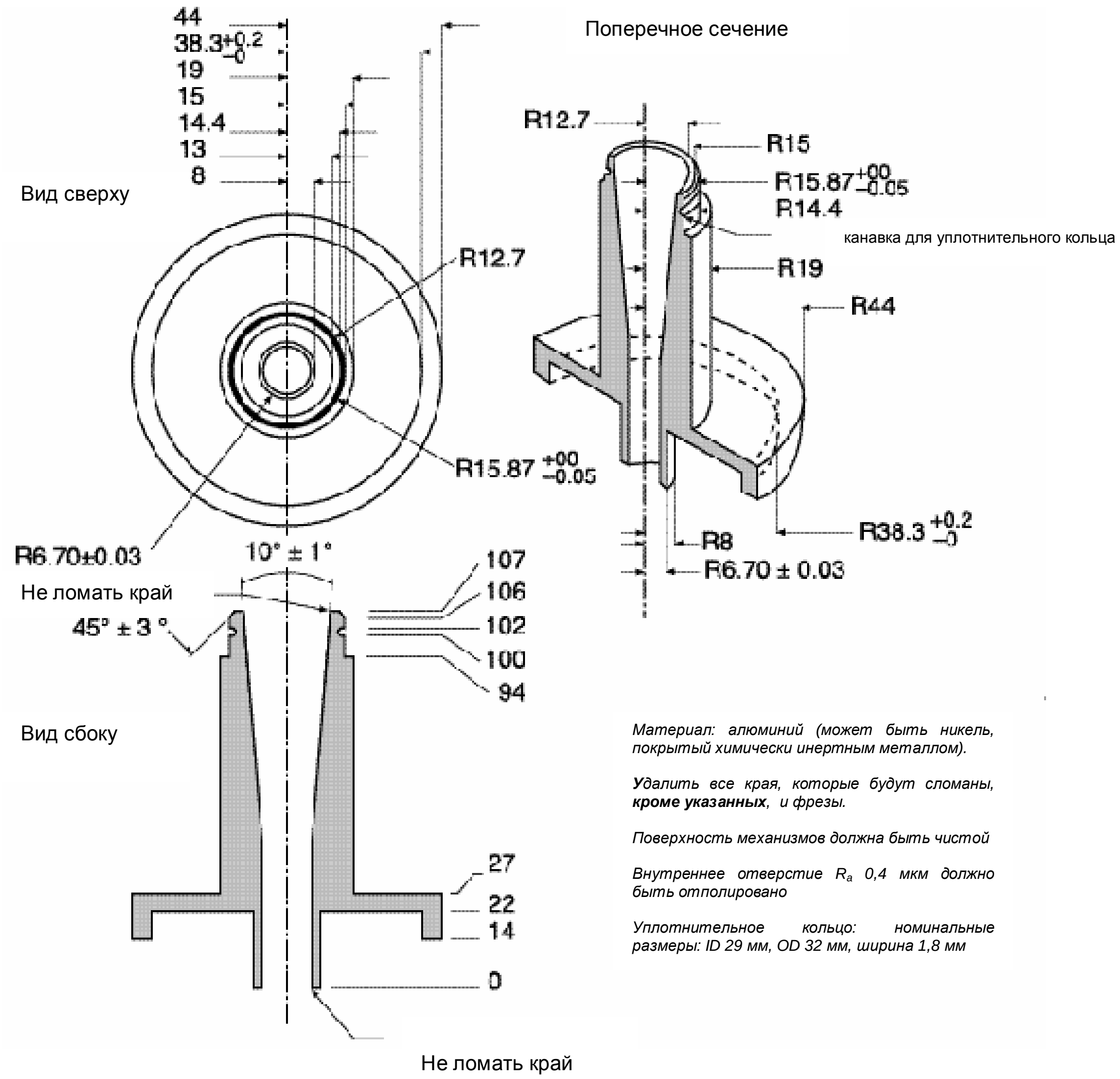


Рисунок 2.9.18.-10. – Соединение входного отверстия с пре-сепаратором пробоотборника «Андерсен».

Методика для ингаляторов под давлением. Собирают «Андерсен»: соединяют пробоотборник с соответствующим фильтром и проверяют систему на герметичность. Мундштук адаптера располагают в конце входного отверстия таким образом, чтобы конец наконечника мундштука находился на одном уровне с горизонтальной осью входного отверстия, а ингалятор был ориентирован в рабочую позицию. Насос соединяют с выходным отверстием прибора и регулируют поток воздуха через прибор со скоростью на входе 28,3±1,5 л/мин. Отключают поток воздуха.

Если нет других указаний в инструкции по применению, встряхивают ингалятор в течение 5 с и высвобождают одну дозу в воздух. Присоединяют насос к прибору, вставляют наконечник в адаптер и опорожняют ингалятор, перевернув вверх, в прибор. Нажимают дозирующий клапан до полного опорожнения.

Отсоединяют ингалятор от адаптера. Повторяют процедуру. Количество высвобождений должно быть минимальным, как правило, не более десяти. Через 5 с после последнего высвобождения отключают насос.

Демонтируют ступень фильтра прибора. Аккуратно извлекают фильтр и смывают действующее вещество растворителем, указанным в частной статье. Отсоединяют входное отверстие и мундштук адаптера от прибора и смывают

действующее вещество растворителем. При необходимости смачивают распылитель снаружи растворителем. Смывают действующее вещество с внутренних стенок и помещают пластинки всех четырех верхних ступеней прибора в объем растворителя, указанный в частной статье.

Используя аналитический метод, указанный в частной статье, определяют количество действующего вещества в каждом из девяти собранных объемов растворителей.

Рассчитывают концентрацию мелких частиц по методике, приведенной ниже.

Методика для порошковых ингаляторов. Чтобы оценить порошковый ингалятор, пробоотборник «Андерсен» не обязательно включать со скоростью 28,3 л/мин. В этом случае данные предыдущей калибровки неприменимы. Поэтому необходимо перед испытанием откалибровать прибор в данных условиях.

Соединяют пробоотборник «Андерсен» с пре-сепаратором и соответствующим фильтром и проверяют герметичность системы. Для обеспечения эффективного поглощения частиц каждую пластину смазывают *глицерином Р* или аналогичной жидкостью с высокой степенью вязкости, не содержащей летучих растворителей. Пре-сепаратор должен быть обработан тем же способом или должен содержать 10 мл растворителя, указанного в частной статье. Соединяют прибор с системой регулирования потока как указано на схеме, представленной на Рисунке 2.9.18.-8. Если нет других указаний, пропускают через прибор 4 л воздуха. При высокой скорости потока может понадобиться отсоединение нижних стеклянных ступеней. Соединяют измеритель скорости потока, отрегулированный на измерение объема, оставляя метр, с входным отверстием. Регулируют контрольный клапан таким образом, чтобы достичь постоянной скорости потока через систему, Q (± 5%). Контролируют критический поток в контрольном клапане, как описано в процедуре для ПРИБОРА С. Отключают поток воздуха.

Готовят порошковый ингалятор как указано в инструкции по применению. При включенном насосе и закрытом двустороннем клапане вставляют наконечник ингалятора в адаптер. Высвобождают порошок в прибор, открыв клапан на необходимое время, T (± 5%). Повторяют процедуру. Количество высвобождений должно быть минимальным, как правило, не более десяти. Через 5 с после последнего высвобождения отключают насос.

Демонтируют аппарат. Аккуратно извлекают фильтр и смывают действующее вещество растворителем, указанным в частной статье. Удаляют пре-сепаратор, входное отверстие и мундштук адаптера от прибора и смывают действующее вещество растворителем. Смывают действующее вещество с внутренних стенок и помещают пластинки всех четырех верхних ступеней прибора в количество растворителя, указанное в частной статье.

Используя аналитический метод, указанный в частной статье, определяют количество действующего вещества в каждом из девяти собранных объемов растворителей.

Рассчитывают концентрацию мелких частиц по методике, приведенной ниже.

Оценка результатов

При испытании растворов рассчитывают массу действующего вещества, полученную на каждой ступени и массу действующего вещества в одном выбросе во входном отверстии, мундштуке адаптера и, если используется, в пре-сепараторе. Общая масса действующего вещества должна быть не менее 75% и не более 125% средней дозы, определенной при однородности дозирования. Если общая масса выходит за эти пределы, испытание повторяют.

Начиная с фильтра, определяют кумулятивную массу на диаметр соответствующей ступени (Таблица 2.9.18.-5 для Аппарата C или Таблица 2.9.18.-6 для Аппарата D).

Методом интерполяции рассчитывают массу действующего вещества менее 5 мкм. Это концентрация мелких частиц (КМЧ – Концентрация Мелких Частиц).

Если необходимо строят график зависимости общей фракции действующего вещества и диаметра на разрезе (Таблицы 2.9.18.-5/6) на логарифмической бумаге. Этот график используют для определения значений средней массы аэродинамического диаметра (СМАД – Средняя Масса Аэродинамического Диаметра) и стандартного геометрического отклонения (СГО – Стандартное Геометрическое Отклонение). Для расчетов можно использовать соответствующие компьютерные программы.

Таблица 2.9.18.-6

Расчеты для Аппарата D при использовании скорости 28,3 л/мин

Диаметр на разрезе (мкм)	**Масса действующего вещества высвобожденного при опорожнении**	**Кумулятивная масса действующего вещества высвобожденного при опорожнении**	**Кумулятивная фракция действующего вещества (%)**
d_7 = 0,4	масса на ступени 8, m_8	$c_7 = m_8$	$f_7 = (c_7/c) \cdot 100$
d_6 = 0,7	масса на ступени 7, m_7	$c_6 = c_7 + m_7$	$f_6 = (c_6/c) \cdot 100$
d_5 = 1,1	масса на ступени 6, m_6	$c_5 = c_6 + m_6$	$f_5 = (c_5/c) \cdot 100$
d_4 = 2,1	масса на ступени 5, m_5	$c_4 = c_5 + m_5$	$f_4 = (c_4/c) \cdot 100$
d_3 = 3,3	масса на ступени 4, m_4	$c_3 = c_4 + m_4$	$f_3 = (c_3/c) \cdot 100$
d_2 = 4,7	масса на ступени 3, m_3	$c_2 = c_3 + m_3$	$f_2 = (c_2/c) \cdot 100$
d_1 = 5,8	масса на ступени 2, m_2	$c_1 = c_2 + m_2$	$f_1 = (c_1/c) \cdot 100$
d_0 = 9,0	масса на ступени 1, m_1	$c_0 = c_1 + m_1$	$f_0 = (c_0/c) \cdot 100$
	масса на ступени 0, m_0	$c = c_0 + m_0$	100

2.9.19. ЗАГРЯЗНЕНИЕ МЕХАНИЧЕСКИМИ ВКЛЮЧЕНИЯМИ: НЕВИДИМЫЕ ЧАСТИЦЫ.

Механическими включениями в инъекционных и инфузионных растворах являются инородные, подвижные, нерастворимые частицы, за исключением пузырьков газа, случайно оказавшихся в растворе. Существует два метода определения загрязнения механическими включениями, описанных ниже: метод 1 - метод подсчёта количества частиц в режиме светотени и метод 2 - метод подсчёта частиц при помощи микроскопа. При испытании инъекционных и инфузионных растворов на наличие механических включений, невидимых невооруженным глазом, использование метода 1 является предпочтительным. Однако, после проведения подсчёта частиц при помощи микроскопа, для некоторых лекарственных средств может возникнуть необходимость подсчета частиц методом 2, чтобы сделать заключение, соответствующее требованиям, предъявляемым к лекарственному средству.

Не все парентеральные лекарственные средства могут быть испытаны на наличие механических включений, невидимых невооруженным глазом, с использованием одного или обоих этих методов. Когда метод 1 неприменим, например, если лекарственное средство не достаточно прозрачно или обладает повышенной вязкостью (например, эмульсии, коллоидные и липосомальные лекарственные средства), испытание проводят по методу 2. Соответственно, для

лекарственных средств, в которых происходит выделение воздуха или пузырьков газа при их помещении в измерительное устройство, может потребоваться проведение подсчета количества частиц при помощи микроскопа. Если вязкость испытуемого лекарственного средства достаточно высока для того, чтобы проводить испытание при помощи одного из описанных методов, для понижения вязкости проводят количественное разбавление путём добавления соответствующего количества разбавителя.

Результаты, полученные при испытании каждого отдельного образца или группы образцов на загрязнение механическими включениями, не могут быть с уверенностью экстраполированы на другие, неиспытанные образцы. Таким образом, должны быть разработаны статистически достоверные схемы отбора образцов, если выводы об уровне загрязнения частицами делаются на основании анализа большой группы образцов.

МЕТОД 1. ПОДСЧЕТ КОЛИЧЕСТВА ЧАСТИЦ В РЕЖИМЕ СВЕТОТЕНИ

Используют соответствующий прибор, принцип действия которого основан на блокировке подачи света, который позволяет автоматически определять размеры и количество частиц в соответствии с их размером.

Прибор калибруют с использованием соответствующего сертифицированного стандартного материала, представляющего собой дисперсионную взвесь сферических частиц с размером от 10 мкм до 25 мкм. Стандартные частицы диспергированы в *воде, свободной от частиц, Р.* Следует избегать агрегации частиц во время дисперсии.

Общие указания

Испытание выполняют в условиях, ограничивающих попадание механических включений, предпочтительно в камере ламинарного потока.

Тщательно моют стеклянную посуду и используемое оборудование для фильтрации, за исключением мембранных фильтров, тёплым раствор моющего средства и последующим ополаскиванием большим количеством воды для удаления следов моющего средства. Непосредственно перед испытанием прибор ополаскивают сверху донизу, снаружи и затем внутри *водой, свободной от частиц, Р.*

Необходимо исключать попадание пузырьков воздуха в испытуемый образец, особенно при переносе пробы в ёмкость, в которой будет проводиться испытание.

Необходимо убедиться в соответствии среды требованиям к проведению испытания: стеклянная посуда должна быть очищена и должны отсутствовать механические включения в используемой воде. Для этого проводят следующий тест: определяют наличие механических включений в пяти пробах *воды, свободной от частиц, Р*, каждая объёмом по 5 мл, согласно методике, описанной ниже. Если в 25 мл для пяти объединенных проб число частиц размером 10 мкм и более превышает 25, предпринятые меры предосторожности недостаточны. Обработку повторяют до тех пор, пока среда, стеклянная посуда и вода не будут пригодными для проведения испытания.

Методика

Перемешивают содержимое образца, медленно и непрерывно переворачивая контейнер 20 раз. Если необходимо, осторожно удаляют колпачки. Внешнюю поверхность вскрываемого контейнера очищают струёй *воды, свободной от частиц, Р* и вскрывают контейнер, избегая какого-либо загрязнения содержимого.

Для удаления пузырьков воздуха дают отстояться в течение 2 мин или обрабатывают ультразвуком.

При испытаниях парентеральных лекарственных средств большого объёма испытывают одиночные образцы. При испытаниях парентеральных лекарственных средств малого объёма (менее 25 мл) содержимое 10 или более образцов смешивают в чистой ёмкости до получения объёма не менее 25 мл; если указано в частных статьях, испытуемый раствор может быть приготовлен путём смешивания содержимого соответствующего количества контейнеров и разбавления *водой, свободной от частиц, Р* или растворителем, указанным в частной статье, не содержащем механических включений, если *вода, свободная от частиц, Р*, является неподходящей. Парентеральные лекарственные средства объёмом 25 мл и более могут испытываться отдельно.

Порошки для приготовления лекарственных средств для парентерального применения ресуспендируются с *водой, свободной от частиц, Р* или растворителем, указанным в частной статье, не содержащим механических включений, если *вода, свободная от частиц, Р* является неподходящей.

Количество испытываемых образцов должно обеспечивать статистически достоверную оценку данных. Для испытания больших объёмов парентеральных лекарственных средств или малых объёмов парентеральных лекарственных средств, имеющих объем 25 мл и более, можно провести испытание менее 10 образцов по схеме отбора образцов.

Отбирают четыре пробы, каждая объёмом не менее 5 мл, и определяют количество частиц размером равным или более 10 мкм и 25 мкм. Исключают результат, полученный для первой пробы, и рассчитывают среднее количество частиц в испытуемом образце.

Оценка результатов

К лекарственным средствам, выпускаемых в контейнере номинальным объёмом более 100 мл, применяют требования теста 1.А.

К лекарственным средствам, выпускаемых в контейнере номинальным объёмом менее 100 мл, применяют требования теста 1.В.

К лекарственным средствам, выпускаемых в контейнере номинальным объёмом 100 мл, необходимо применяют требования теста 1.В.

Если среднее количество частиц превышает допустимые нормы, испытание лекарственного средства проводят, используя метод подсчета количества частиц при помощи микроскопа.

Тест 1.А. - Растворы для инфузий или инъекционные растворы, выпускаемые в контейнере номинальным объемом более 100 мл.

Лекарственное средство выдерживают испытание, если в испытуемых образцах среднее количество частиц с размером 10 мкм и более не превышает 25 в одном миллилитре и количество частиц с размером 25 мкм и более не превышает 3 в одном миллилитре.

Тест 1.В. - Растворы для инфузий или инъекционные растворы, выпускаемые в контейнере номинальным объемом менее 100 мл.

Лекарственное средство выдерживают испытание, если в испытуемых образцах среднее количество частиц размером 10 мкм и более не превышает 6000 в одном контейнере и количество частиц размером 25 мкм и более не превышает 600 в одном контейнере.

МЕТОД 2. ПОДСЧЕТ КОЛИЧЕСТВА ЧАСТИЦ ПРИ ПОМОЩИ МИКРОСКОПА

Используют соответствующий бинокулярный микроскоп, комплект фильтров для сбора механических включений и мембранный фильтр для проведения

испытания. Микроскоп оснащен окулярным микрометром, калиброванным по объект-микрометру, предметным столиком, 2 соответствующими осветительными приборами для обеспечения эпископического освещения в дополнение к отраженному освещению и предназначается для увеличения в 100±10 раз.

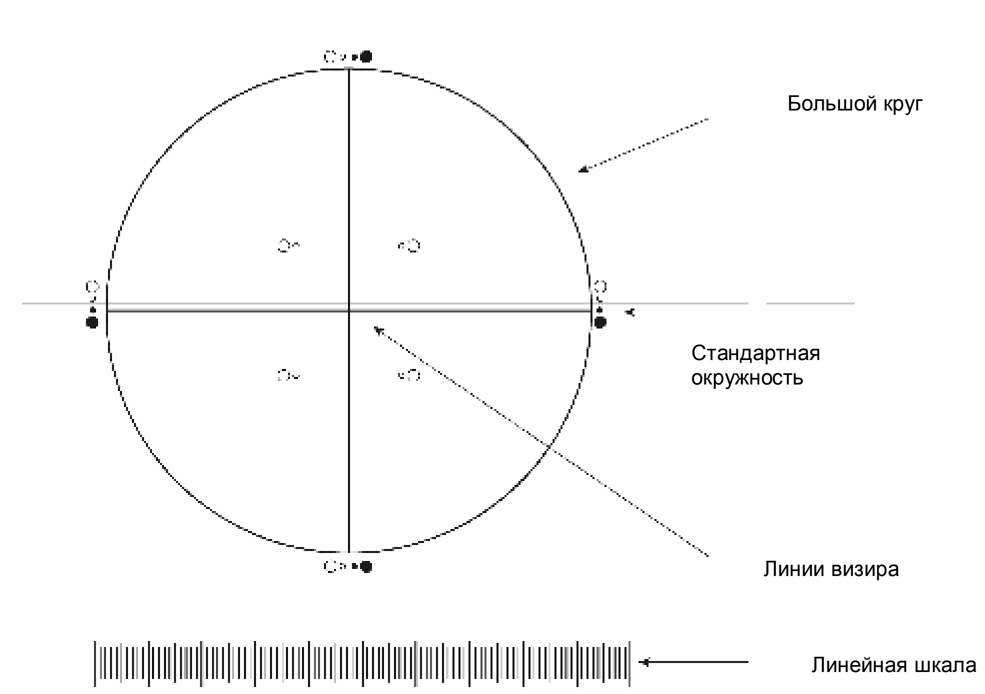


Рисунок 2.9.19.-1.- Окружность, разделенная по диаметру

Окулярный микрометр представляет собой окружность, разделенную по диаметру (см. Рисунок 2.9.19.1-1) и состоит из большого круга, разделенного перекрестиями на квадранты, прозрачные и черные стандартные окружности диаметром 10 мкм и 25 мкм при стократном увеличении, и линейной шкалы с делениями по 10 мкм. Калибровка выполнена при помощи стандартного микрометра, соответствующего международным или национальным стандартам. Допустимая относительная погрешность линейной шкалы при делении на квадранты составляет ± 2 %. Большой круг служит для определения поля зрения.

Требуется два источника света: эпископический, с широким полем охвата, направленный внутрь микроскопа, и внешний, дополнительный, под углом 10-20^{o} для обеспечения отраженного освещения.

Комплект фильтров для сбора механических включений состоит из держателя фильтра, изготовленного из стекла или другого соответствующего материала, вакуумного насоса и соответствующего мембранного фильтра.

Мембранный фильтр должен иметь соответствующий размер, должен быть черного или темно-серого цвета, с нанесенной разметкой или без разметки и с номинальным диаметром пор 1,0 мкм или менее.

Общие указания

Испытание выполняют в условиях, ограничивающих попадание механических включений, предпочтительно в камере ламинарного потока.

Тщательно моют стеклянную посуду и используемое оборудование для фильтрации, за исключением мембранных фильтров, тёплым раствором моющего средства и последующим ополаскиванием большим количеством воды для удаления следов моющего средства. Непосредственно перед испытанием обе

стороны мембранного фильтра и оборудование сверху донизу, снаружи и затем внутри ополаскивают *водой, свободной от частиц, Р.*

Необходимо убедиться в соответствии среды требованиям к проведению испытания: стеклянная посуда должна быть очищена и должны отсутствовать механические включения в используемой воде. Для этого проводят следующий тест: определяют наличие механических включений в 50 мл *воды, свободной от частиц, Р*, как описано ниже. Если содержание в фильтрате частиц размером 10 мкм и более превышает 20 или частиц размером 25 мкм и более превышает 5, предпринятые меры предосторожности недостаточны. Обработку повторяют до тех пор, пока среда, стеклянная посуда, вода и мембранный фильтр не будут пригодными для проведения испытания.

Методика

Перемешивают содержимое образца, медленно и непрерывно переворачивая контейнер 20 раз. Если необходимо, осторожно удаляют колпачки. Внешнюю поверхность вскрываемого контейнера очищают струёй *воды, свободной от частиц, Р* и вскрывают контейнер, избегая какого-либо загрязнения содержимого. При испытаниях парентеральных лекарственных средств большого объёма испытываются одиночные образцы. При испытаниях парентеральных лекарственных средств малого объёма (менее 25 мл) содержимое 10 или более образцов смешивается в чистой ёмкости до получения объёма не менее 25 мл; если указано в частных статьях, испытуемый раствор может быть приготовлен путём смешивания содержимого соответствующего количества контейнеров и разбавления *водой, свободной от частиц, Р* или растворителем, указанным в частной статье, не содержащем механических включений, если *вода, свободная от частиц, Р,* является неподходящей. Парентеральные лекарственные средства объёмом 25 мл и более могут испытываться отдельно.

Порошки для приготовления лекарственных средств для парентерального применения разбавляются *водой, свободной от частиц, Р* или растворителем, указанным в частной статье, не содержащим механических включений, если *вода, свободная от частиц*, *Р* является неподходящей.

Количество испытываемых образцов должно обеспечивать статистически достоверную оценку данных. Для испытания больших объёмов парентеральных лекарственных средств или малых объёмов парентеральных лекарственных средств, имеющих объем 25 мл и более, можно провести испытание менее 10 образцов по схеме отбора образцов.

Отбирают четыре пробы, каждая объёмом не менее 5 мл, и определяют количество частиц размером равным или более 10 мкм и 25 мкм. Исключают результат, полученный для первой пробы, и рассчитывают среднее количество частиц в испытуемом образце.

Внутреннюю поверхность держателя фильтра, соединенного с мембранным фильтром, увлажняют несколькими миллилитрами *воды, свободной от частиц, Р*. В фильтрационную воронку помещают весь раствор или объём одного образца и используют вакуум. При необходимости, раствор добавляют постепенно порциями, пока не профильтруется весь объем лекарственного средства. После добавления последней порции раствора промывают внутренние стенки держателя фильтра струёй *воды, свободной от частиц, Р*. Не допускают проникновения воздуха до тех пор, пока на поверхности мембранного фильтра не останется жидкости. Фильтр помещают в чашку Петри и сушат его на воздухе со слегка приоткрытой крышкой. После того, как фильтр высохнет, чашку Петри помещают на предметный столик микроскопа, рассматривают мембранный фильтр в отражённом свете и подсчитывают количество частиц размером 10 мкм

и более и количество частиц размером 25 мкм и более. В качестве альтернативы допускается проведение частичного либо полного подсчёта количества частиц на фильтре. Вычисляют среднее количество частиц в испытуемом лекарственном средстве.

Размер частиц определяют при помощи разделенной по диаметру окружности путём воображаемого наложения изображения каждой частицы на окружность с последующим сравнением со стандартно размеченными окружностями размером 10 мкм и 25 мкм. Таким образом, частицы не перемещают с места их первоначального расположения в поле зрения и не накладывают на стандартные окружности для сравнения. Внутренний диаметр прозрачных стандартных окружностей используют для определения размера белых и прозрачных частиц, в то время как размер тёмных частиц определяют, используя наружный диаметр чёрных непрозрачных стандартных окружностей.

При выполнении испытания методом подсчёта количества частиц при помощи микроскопа не следует пытаться определить размер или количество аморфных, полужидких или других морфологически неясных материалов, имеющих вид пятна или обесцвечивающихся на мембранном фильтре. Эти частицы могут иметь небольшой поверхностный рельеф, быть желеобразными или иметь плёночную поверхность. В таких случаях проводится испытание образца раствора методом подсчёта количества частиц в режиме светотени.

Оценка результатов

К лекарственным средствам, выпускаемых в контейнере номинальным объёмом более 100 мл, применяют требования теста 2.А.

К лекарственным средствам, выпускаемых в контейнере номинальным объёмом менее 100 мл, применяют требования теста 2.В.

К лекарственным средствам, выпускаемых в контейнере номинальным объёмом 100 мл, применяют требования теста 2.В.

Если среднее количество частиц превышает допустимые нормы, испытание лекарственного средства проводят, используя метод подсчета количества частиц при помощи микроскопа.

Тест 2.А. - Растворы для инфузий или инъекционные растворы, выпускаемые в контейнере номинальным объемом более 100 мл.

Лекарственное средство выдерживают испытание, если в испытуемых образцах среднее количество частиц с размером 10 мкм и более не превышает 12 в одном миллилитре и количество частиц с размером 25 мкм и более не превышает 2 в одном миллилитре.

Тест 2.В. - Растворы для инфузий или инъекционные растворы, выпускаемые в контейнере номинальным объемом менее 100 мл.

Лекарственное средство выдерживают испытание, если в испытуемых образцах среднее количество частиц размером 10 мкм и более не превышает 3000 в одном контейнере и количество частиц размером 25 мкм и более не превышает 300 в одном контейнере.

2.9.20. ЗАГРЯЗНЕНИЕ МЕХАНИЧЕСКИМИ ВКЛЮЧЕНИЯМИ: ВИДИМЫЕ ЧАСТИЦЫ

Механическими включениями в инъекционных и инфузионных растворах являются посторонние подвижные нерастворимые частицы, за исключением пузырьков газа, случайно оказавшихся в растворе.

Испытание предназначено для визуальной оценки качества парентеральных растворов на наличие видимых частиц. Могут использоваться другие валидированные методы.

ПРИБОР

Прибор (см. Рисунок 2.9.20.-1) состоит из устройства для просмотра, включающего:

- чёрный матовый экран подходящего размера, находящийся в вертикальном положении;
- белый матовый экран подходящего размера, находящийся в вертикальном положении, рядом с чёрный экраном;
- регулируемый плафон, снабжённый подходящим затемнённым источником дневного света с подходящим отражателем (осветитель может состоять из 2 флуоресцентных ламп по 13 Вт, каждая, длиной 525 мм). Интенсивность освещения в точке контроля должна быть от 2 000 люксов до 3 750 люкс; для цветных стеклянных и пластмассовых контейнеров предпочтительно использовать более высокие мощности света.

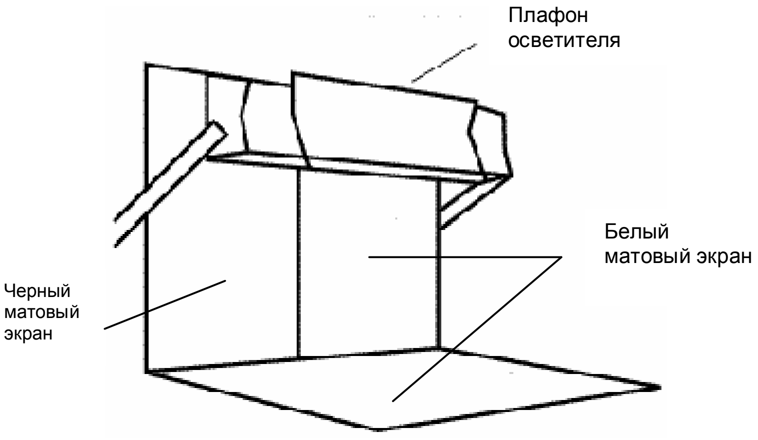


Рисунок 2.9.20.–1. – *Прибор для обнаружения видимых частиц*

МЕТОДИКА

Удаляют наклеенные этикетки с контейнера, моют его снаружи и сушат. Плавно вращают или переворачивают контейнер, избегая образования воздушных пузырьков, и просматривают в течение около 5 с перед белым экраном. Повторяют эту процедуру перед черным экраном. Отмечают наличие любых частиц.

2.9.21. ЗАГРЯЗНЕНИЕ МЕХАНИЧЕСКИМИ ВКЛЮЧЕНИЯМИ: МЕТОД МИКРОСКОПИИ

Механическими включениями в инъекционных и внутривенных инфузионных растворах являются посторонние подвижные нерастворимые частицы, за исключением пузырьков газа, случайно оказавшихся в растворе.

Данное испытание предназначено для установления природы частиц, которые могут присутствовать в растворе, и для определения их характеристик. Оно может указывать на возможный источник загрязнения. Эта информация позволит производителю принять меры для предотвращения загрязнений.

ОБЩИЕ УКАЗАНИЯ

Все процедуры выполняют в зоне ламинарного потока.

Подготовка материалов. Тщательно моют стеклянную посуду и используемое фильтрационное оборудование, за исключением мембранных фильтров, тёплым раствором моющего средства и ополаскивают большим количеством *воды Р* для удаления всех следов моющего средства. Непосредственно перед испытанием ополаскивают указанное выше оборудование сверху донизу, снаружи и затем внутри *водой, свободной от частиц, Р*.

ПРИБОР

Используют вакуум-фильтрационную систему, изготовленную из нержавеющей стали или стекла и оборудованную мембранным фильтром с нанесенной сеткой, который имеет соответствующую пористость и цвет.

Может использоваться бинокулярный микроскоп, оснащенный:

- ахроматическим объективом с увеличением х10,
- окулярами с увеличением х10, из которых, по крайней мере, один снабжен сеткой, позволяющей точно измерять частицы размером 10 мкм и более,
- системой освещения для наблюдения с падающим или отраженным светом,
- объект-микрометром для калибровки сетки окуляра.

МЕТОДИКА

Сборка мембранного фильтра и прибора для фильтрации. Ополаскивают воронку и основание держателя фильтра *водой, свободной от частиц, Р*; предварительно вымытым пинцетом берут мембранный фильтр с сеткой; для удаления всех частиц ополаскивают обе стороны фильтра *водой, свободной от частиц, Р*, держа фильтр в вертикальном положении и медленно направляя струю воды из стороны в сторону, начиная сверху и донизу. Промытый фильтр помещают сеткой вверх на основание держателя фильтра вакуум-фильтрационного аппарата и центруют. Устанавливают фильтрационную воронку на основание фильтродержателя, без сдвига ее по стороне сетки фильтра. Вращают собранный блок, ополаскивая внутренние стенки воронки и поверхность фильтра струёй *воды, свободной от частиц, Р,* в течение около 15 с. Подсоединяют блок к емкости для фильтрации.

Фильтрация испытуемого образца. 25 мл испытуемого лекарственного средства тщательно перемешивают и переносят в фильтрационный аппарат. Дают отстояться в течение около 1 мин. Проводят вакуум-фильтрацию. Медленно отключают вакуум и ополаскивают внутренние стенки воронки струёй *воды, свободной от частиц, Р.* Не допускается направлять струю воды на поверхность фильтра. После прохождения всего раствора через воронку вакуумного насоса, фильтруют смывы под вакуумом. После завершения фильтрации вакуум отключают не сразу, чтобы подсушить фильтр. Аккуратно удаляют воронку; стальным пинцетом, предварительно отмытым струей *воды, свободной от частиц, Р,* переносят фильтр в чистую чашку Петри. Накрывают чашку чистой крышкой так, чтобы она была немного приоткрыта. Помещают чашку в зону ламинированного потока для подсушки фильтра, избегая образования сгибов. Затем помещают чашку Петри на предметный столик микроскопа и подсчитывают количество частиц на фильтре, как описано ниже.

Подготовка контрольной пробы. Готовят контрольную пробу так же, как и испытуемый образец. Контрольную пробу проводят с 25 мл *воды, свободной от*

частиц, P, пропущенной непосредственно через воронку вакуум-фильтрационной системы.

Градуировка микроскопа. Градуируют сетку окуляра микроскопа, используя объект-микрометр.

Определение. Можно использовать как визуальный подсчет, так и электронный регистрирующий прибор. Исследуют всю поверхность фильтра при увеличении x100 и освещении падающим или отраженным светом. Подсчитывают количество частиц размером 10 мкм и более и классифицируют их по предварительно выбранным диапазонам размеров. Для каждого диапазона из количества частиц в испытуемом образце вычитают количество частиц того же диапазона в контрольной пробе. Если в контрольной пробе обнаруживают более пяти частиц размером 25 мкм или более, условия проведения испытания считаются неудовлетворительными, и испытание повторяют.

Оценка результатов. Если возможно, устанавливают природу обнаруженных частиц и определяют их характеристики. Если необходимо, число обнаруженных частиц регистрируют.

2.9.22. ОПРЕДЛЕНИЕ ВРЕМЕНИ ДЕФОРМАЦИИ ЛИПОФИЛЬНЫХ СУППОЗИТОРИЕВ

Данное испытание позволяет определить, при заданных условиях, время необходимое для деформации суппозиториев с момента помещения суппозитория в воду до момента, когда лекарственное средство не оказывает сопротивления определенному приложенному весу.

ПРИБОР А

Прибор (см. Рисунок 2.9.22.-1) состоит из стеклянной трубки с плоским дном с внутренним диаметром 15,5 мм и длиной около 140 мм. Трубка закрывается съёмной пластмассовой крышкой с отверстием диаметром 5,2 мм. Прибор содержит стержень диаметром 5,0 мм, который расширяется книзу до диаметра 12 мм. К нижней, плоской стороне стержня крепится металлическая игла длиной 2 мм и диаметром 1 мм.

Стержень состоит их 2-х частей, нижней части, изготовленной из пластмассы, и верхней части, изготовленной из пластмассы или металла с диском, определенной массы. Верхняя и нижняя части либо соединены друг с другом (ручной вариант), либо отделяются (автоматизированная версия). Вес всего стержня 30 $\pm$ 0,4 г. На верхней части стержня имеется свободно скользящее маркировочное кольцо. Когда стержень, введенный в стеклянную трубку, достигает дна, маркировочное кольцо поднимается на уровень верхнего края пластмассовой крышки.

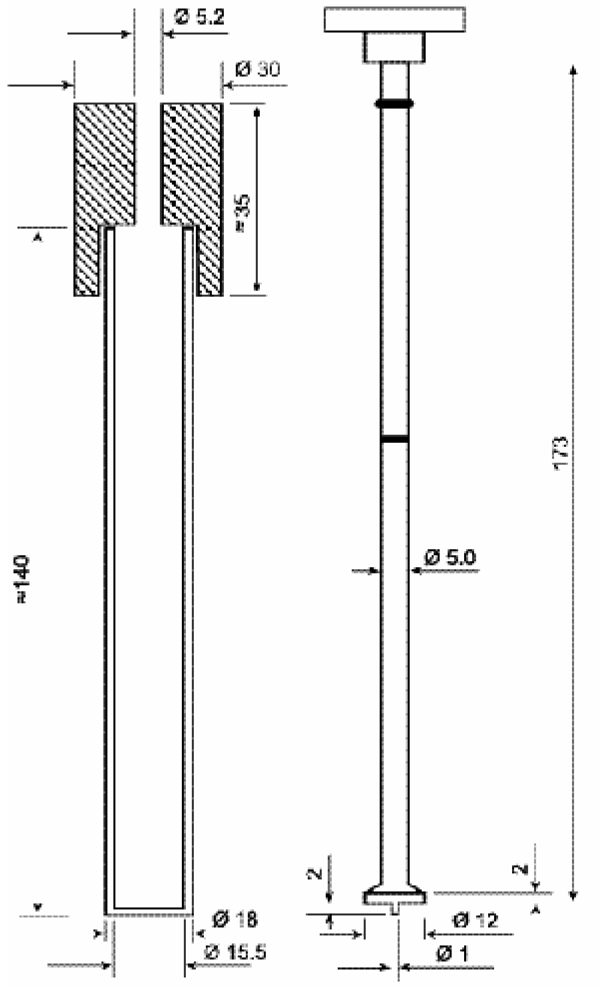


Рисунок 2.9.22.-1. – Прибор А для измерения времени деформации липофильных суппозиториев
Размеры указаны в миллиметрах.

Методика. Помещают стеклянную трубку, которая содержит 10 мл воды, на водяную баню с температурой 36,5±0,5°C. Стеклянную трубку устанавливают вертикально и погружают её на глубину не менее 7 см ниже поверхности, но так, чтобы она не касалась дна водяной бани. В трубку заостренным концом вниз помещают суппозиторий, затем вводят стержень со свободно скользящей крышкой до тех пор, пока металлическая игла не коснется плоского конца суппозитория. Трубку закрывают крышкой. Отсчет времени начинают с этого момента. Регистрируют время, необходимое для достижения стержнем дна стеклянной трубки и время подъёма маркировочного кольца до верхнего края пластмассовой крышки.

ПРИБОР В

Прибор (см. Рисунок 2.9.22.-2) состоит из водяной бани (В), в которую вставлена внутренняя трубка (А) и неподвижный ограничитель. Дно трубки должно быть закрыто ограничителем. Прибор снабжен термометром. Имеется 2 вида вставок:

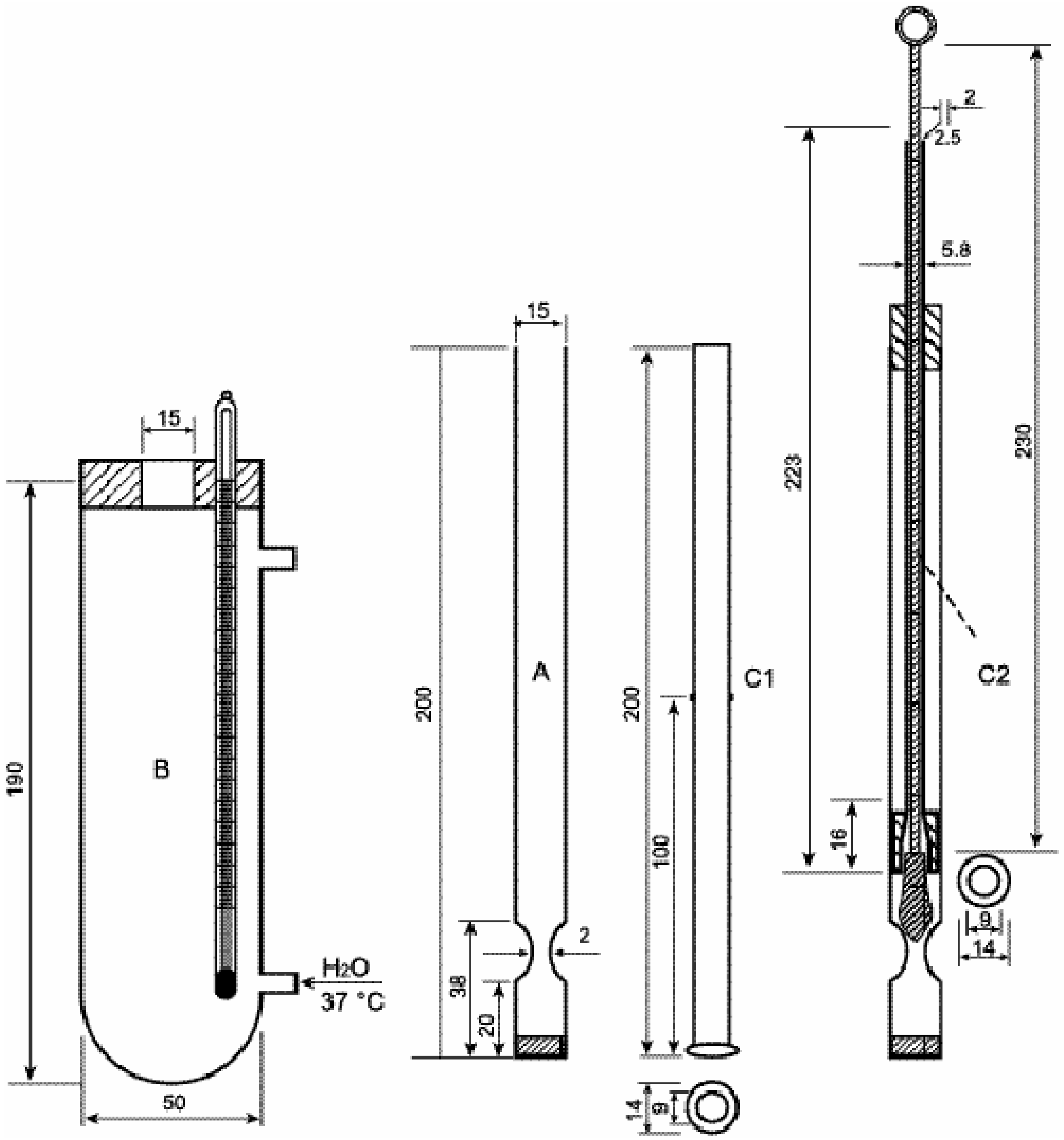


Рисунок 2.9.22.-2. – *Прибор В для измерения времени деформации липофильных суппозиториев*
Размеры указаны в миллиметрах.

- стеклянный стержень (С1) в форме трубки, запаянной с обоих концов, имеющей ободок на нижней части из свинцовой дроби. Вес стержня 30±0,4 г.
- проникающая вставка (С2), состоящая из стержня весом 7,5±0,1 г в трубке, которая имеет углубление для суппозитория; обе части изготовлены из нержавеющей стали.

Методика. Во внутреннюю трубку (А) отмеривают 5 мл воды с температурой 36,5±0,5°С, помещают суппозиторий заостренным концом вниз и вводят вставку (С1 или С2). Отсчет времени начинают с этого момента. Полное размягчение или растворение суппозитория считается законченным, когда нижний край стеклянного стержня с ободком (С1) или стального стержня (С2) достигнет суженной части внутренней стеклянной трубки.

2.9.23. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПЛОТНОСТИ ТВЕРДЫХ ЧАСТИЦ ПРИ ПОМОЩИ ПИКНОМЕТРА

Испытание на определение плотности твёрдых частиц при помощи пикнометра предназначено для определения объёма, занятого определённым количеством порошка, путём измерения объёма газа, вытесненного при определенных условиях. Другими словами, рассчитывается плотность, определенная при помощи пикнометра.

ПРИБОР

Прибор (см. Рисунок 2.9.23.-1) состоит из:

- герметичной испытательной ячейки, содержащей пустую ячейку объёмом (V_c), которая соединена посредством клапана со стандартной ячейкой стандартного объёма (V_r),
- системы, способной под давлением заполнять ячейки газом до достижения определённого давления (P), указанного на манометре,
- системы, которая соединена с источником газа, предпочтительно гелия, если не указан другой газ, для выполнения измерений. При использовании вместо гелия других газов, полученные значения, возможно, будут отличаться от значений при использовании в качестве газа гелия. Проникновение газа зависит от размера пор и площади поперечного сечения проникающей молекулы. Например, плотность, определенная при помощи пикнометра пористых материалов будет иметь значение выше при использовании гелия, чем при использовании азота.

Температура в газовом пикнометре должна быть 15°C - 30°C и не должна изменяться в течение всего процесса измерения более чем на 2°C.

Прибор градуирован, это означает, что объёмы (V_c) и (V_r) определяются при помощи градуированных отполированных стальных шариков с общим объёмом (около 6 см^3) с точностью до 0,001 см^3. Процедура, описанная ниже, выполняется в два этапа: с использованием пустой ячейки для проведения испытания и с использованием стальных шариков, помещенных в испытательную ячейку. Объемы (V_c) и (V_r) рассчитывают при помощи уравнения для определения объёма образца, с учётом того, что на первом этапе объём равен нулю.

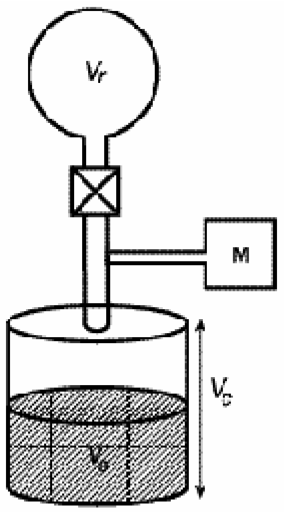


Рисунок 2.9.23.-1. – Схема газового пикнометра

V_r - объём стандартной ячейки

V_c - объём испытательной ячейки

V_s - объем образца
M - манометр

МЕТОДИКА

Взвешивают ячейку для проведения испытания и регистрируют ее массу. Наполняют испытательную ячейку указанным количеством порошка испытуемого лекарственного средства. Плотно закрывают испытательную ячейку в пикнометре. Предварительно удаляют из порошка летучие примеси, дегазируя порошок в токе газа; в некоторых случаях порошки дегазируют вакуумом. Регистрируют указанное на манометре исходное давление (P_r) в системе при открытом клапане, который соединяет стандартную ячейку с испытательной ячейкой. Закрывают клапан для отделения стандартной ячейки от испытательной ячейки. Заполняют испытательную ячейку под давлением газом и определяют давление (P_i), регистрируют полученное значение. Открывают клапан для соединения стандартной ячейки с испытательной ячейкой. Регистрируют конечный показатель давления (P_f). Повторяют испытания образцов того же порошка до тех пор, пока показатель последовательных измерений объёма образца (V_s) не окажется в пределах 0,5%. Объём образца выражается в кубических сантиметрах. Разгружают ячейку для проведения испытания и измеряют конечную массу порошка (m), выраженную в граммах.

РАССЧЁТ РЕЗУЛЬТАТОВ

Объём образца V_s определяется по формуле:

$$V_s = V_c - \frac{V_r}{\frac{P_i - P_r}{P_f - P_r} - 1}$$

Плотность (p) определяют по уравнению:

$$r = \frac{m}{V_s}$$

2.9.24. УСТОЙЧИВОСТЬ СУППОЗИТОРИЕВ И ПЕССАРИЕВ К РАЗРУШЕНИЮ

Данное испытание предназначено для определения устойчивости к разрушению, при заданных условиях, суппозиториев и пессариев, путём измерения массы, необходимой для их разрушения раздавливанием.

Данное испытание проводят для суппозиториев и пессариев, изготовленных на липофильной основе, и не проводится для суппозиториев и пессариев, изготовленных на гидрофильной основе (например, желатин-глицериновая смесь).

Прибор. Прибор (см. Рисунок 2.9.24.-1/2) состоит из:

- термостатической камеры, закрывающейся стеклянным окном с лицевой стороны, с держателем суппозитория или пессария,

- двух тисков, расположенных друг напротив друга, верхние тиски вертикально опускаются на нижние. Сдавливающие поверхности тисков плоские, они устанавливаются перпендикулярно движению, их поверхность по размеру должна быть больше зоны соприкосновения с поверхностью суппозитория или пессария. Пластмассовый держатель образца закрепляется по центру тисков (половина держателя в каждом тиске). Верхние тиски (верхний блок сжатия) соединяют с

подвесным устройством, на стержень которого нанизываются диски массой 200 г каждый. Начальная масса прижимного блока составляет 600 г. Разрушение образца проводят путем последовательного нанизывания на стержень гирь массой 200 г до общей массы 600 г на подвесном устройстве.

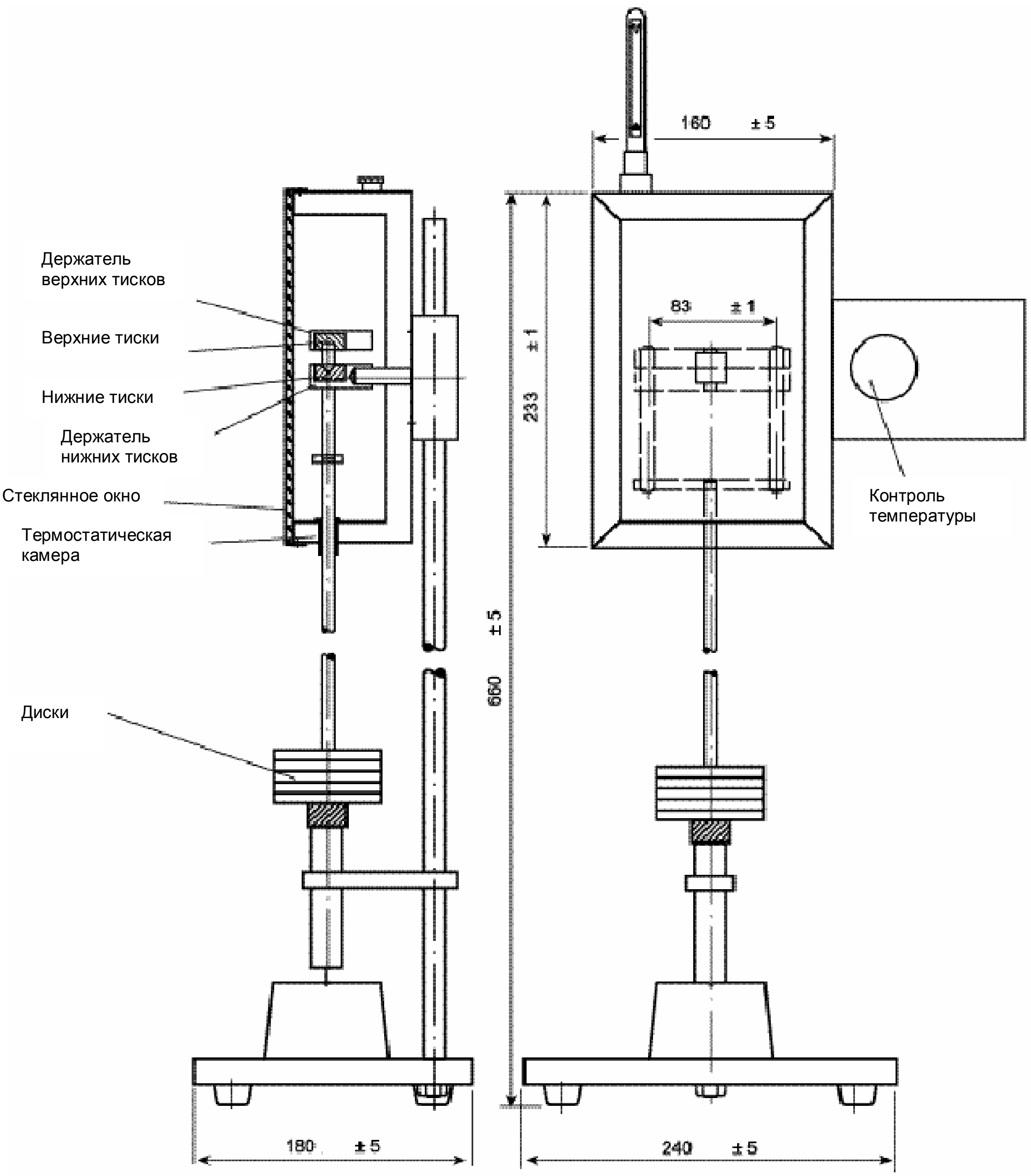


Рисунок 2.9.24.-1. – Прибор для определения устойчивости к разрушению суппозиториев и пессариев

Размеры указаны в миллиметрах

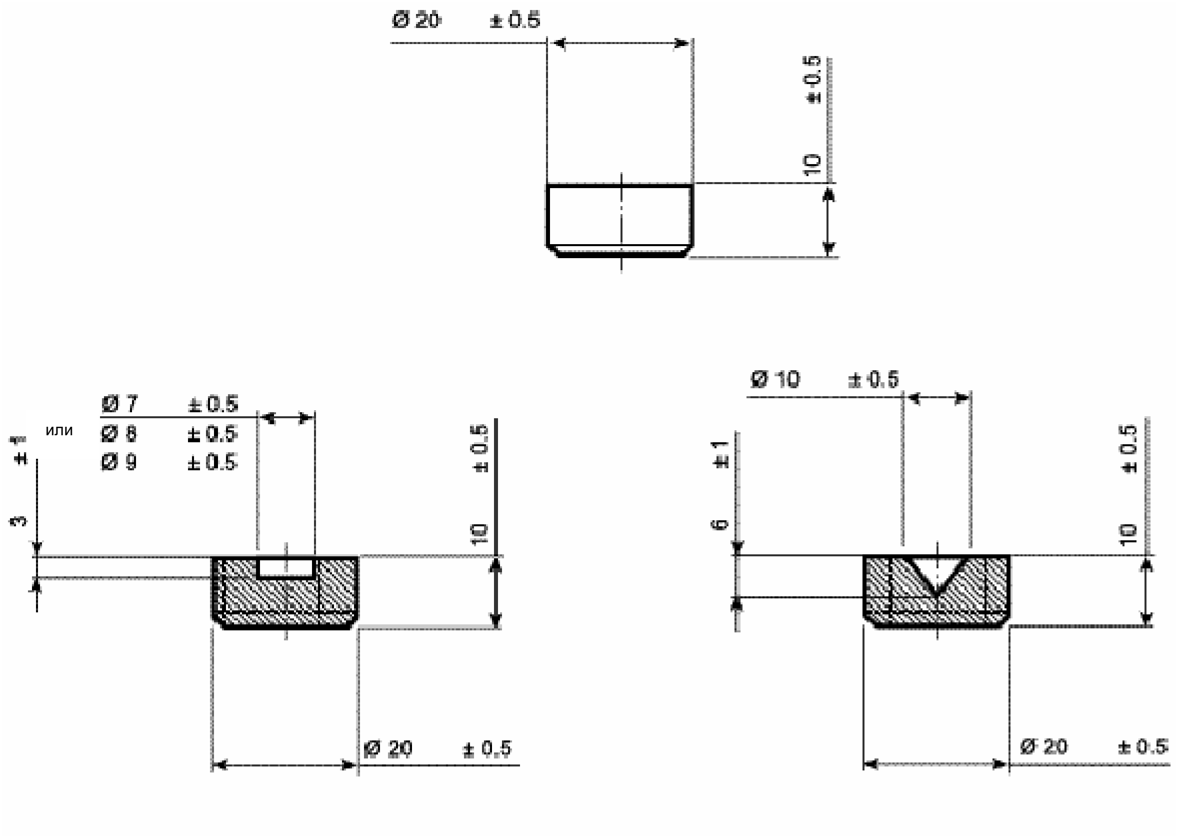


Рисунок 2.9.24.-2. – Нижние и верхние тиски
Размеры указаны в миллиметрах

Методика. Устанавливают прибор в вертикальное положение. Термостатическую камеру нагревают до температуры 25°C. Испытуемое лекарственное средство выдерживают при нужной для проведения испытания температуре в течение не менее 24 ч. Суппозиторий или пессарий помещают вертикально, заостренным концом вверх, между тисками держателей.

Надёжно закрепляют верхний прижимной блок, соединенный с подвесным устройством, и закрывают камеру стеклянным окном. Для каждого определения закрепляют суппозиторий или пессарий одинаково с учётом направления силы сжатия.

Спустя одну минуту нанизывают первый диск массой 200 г. Спустя еще минуту добавляют следующий диск. Процедура повторяют до полного разрушения суппозитория или пессария.

Необходимую для разрушения суппозитория или пессария массу рассчитывают путём суммирования массы, воздействующей на суппозиторий или пессарий в момент его разрушения (с учётом первоначальной массы подвески прибора), и оценивают следующим образом:

- если суппозиторий или пессарий разрушается в течение 20 с с момента нанизывания последнего диска, массу диска не учитывают;
- если суппозиторий или пессарий разрушается в течение 20-40 с с момента нанизывания последнего диска, учитывают только половину массы диска, то есть 100 г;
- если суппозиторий или пессарий остаётся не разрушенным в течение более 40 с с момента нанизывания последнего диска, учитывают массу всех дисков.

Испытание проводят на 10 суппозиториях или 10 пессариях, убедившись в отсутствии остатков суппозиториев или пессариев в приборе перед каждым последующим испытанием.

2.9.25. ВЫСВОБОЖДЕНИЕ АКТИВНОГО ВЕЩЕСТВА ИЗ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ЖЕВАТЕЛЬНЫХ РЕЗИНОК

ПРИНЦИП ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Высвобождение активного вещества из лекарственной жевательной резинки определяют путем механического смешивания пластины жевательной резинки, помещенной в небольшую камеру, моделирующую процесс жевания, с определённым объёмом буферного раствора.

ПРИБОР

Прибор, моделирующий процесс жевания (см. Рисунок 2.9.25.-1), состоит из камеры, моделирующей процесс жевания, объёмом около 40 мл, в которой жевательная резинка подвергается имитации жевания при помощи двух горизонтальных поршней; поршни двигаются одновременно с постоянной скоростью. По окончании имитации процесса жевания поршни могут поворачиваться вокруг своей оси в противоположных направлениях относительно друг друга. Таким образом, жевательная резинка подвергается имитации процесса максимального разжёвывания. Третий, вертикальный поршень («язык»), двигается в противоположном направлении относительно движений горизонтальных поршней и обеспечивает правильное местоположение пластины жевательной резинки в процессе имитации жевания. Поршни приводятся в движение сжатым воздухом, при этом обеспечивается согласованность движений поршней. Все материалы изготавливаются из нержавеющей стали.

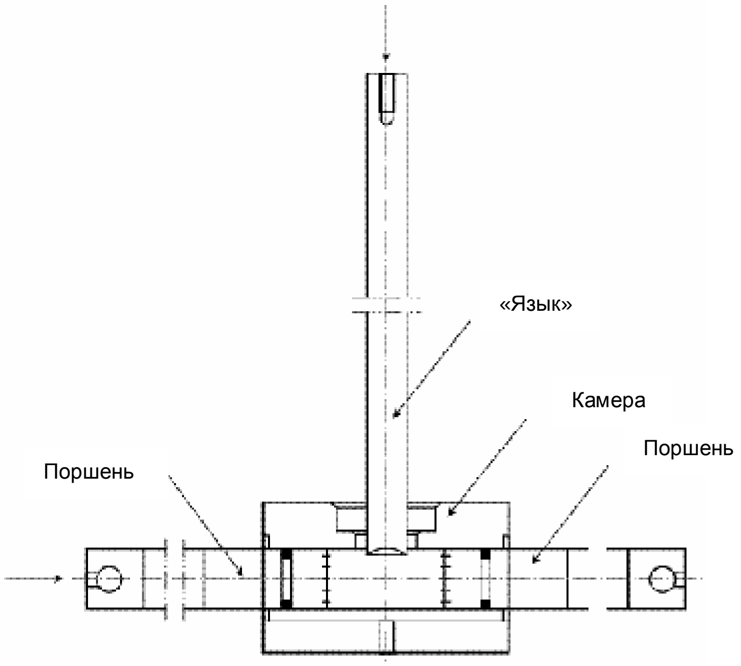


Рисунок 2.9.25.-1. - Прибор для определения количества активного вещества, высвобождаемого из лекарственной жевательной резинки

ПРОЦЕДУРА

Устанавливают в камере, моделирующей процесс жевания, температуру 37± 0,5°C и задают скорость движения поршней. Прибавляют 20 мл буферного раствора с pH около 6, указанного в частной статье, в камеру, моделирующую процесс жевания. Приводят прибор в действие. Пропускают поток буферного раствора в течение 2 мин без закладки жевательной резинки. Удаляют буферный

раствор при помощи пипетки и помещают новую порцию (20 мл) буферного раствора. Анализируют удаленный буферный раствор для контроля качества очистки. Взвешивают с точностью до 0,0001 г часть пластины жевательной резинки, помещают ее в камеру, моделирующую процесс жевания, и приводят прибор в действие. Через заданный интервал времени удаляют образцы из резервуара для определения количества высвобождаемого активного вещества. Скорость процесса жевания обычно устанавливается 60 циклов в минуту. Если необходимо, остатки жевательной резинки извлекаются и сохраняются для последующего анализа.

2.9.26. ОПРЕДЕЛЕНИЕ УДЕЛЬНОЙ ПЛОЩАДИ ПОВЕРХНОСТИ МЕТОДОМ ГАЗОВОЙ АДСОРБЦИИ

I. ВВЕДЕНИЕ

Удельная поверхность порошка – физическая адсорбция газа поверхностью твердого вещества. Определяется измерением количества газа, адсорбированного мономолекулярным слоем поверхности. Физическая адсорбция является результатом действия относительно слабых сил (силы Ван-дер-Ваалса), действующих между молекулами газа адсорбата и адсорбирующей поверхностью испытуемого порошка. Количество адсорбированного газа можно измерить гравиметрическим методом, методом объёмного анализа и методом непрерывного потока.

II. ТЕОРИЯ БРУНАУЭРА, ЭММЕТТА И ТЕЛЛЕРА (БЭТ) И ОПРЕДЕЛЕНИЕ УДЕЛЬНОЙ ПЛОЩАДИ ПОВЕРХНОСТИ

II.1. МНОГОТОЧЕЧНОЕ ИЗМЕРЕНИЕ

Данные обрабатываются согласно уравнению Брунауэра, Эмметта и Теллера (БЭТ) для определения изотермической адсорбции:

$$\frac{1}{[V_a(\frac{P_0}{P}-1)]}=\frac{C-1}{V_mC}\cdot\frac{P}{P_0}\cdot\frac{1}{V_mC}, \qquad (1)$$

где:

- P - частичное давление пара газа адсорбанта при соприкосновении с поверхностью при температуре 196 °С, Па;
- P_o - насыщаемое давление газа адсорбанта, Па;
- V_a - объём газа, адсорбируемого при стандартных температуре и давлении (СТД – стандартные температура и давление) [273,15К и атмосферном давлении ($1{,}013 \times 10^5$ Па)], мл;
- V_m - объём газа, адсорбируемого при СТД для создания видимого мономолекулярного слоя на поверхности образца, мл;
- C - константа, характеризующая теплопроводимость газа адсорбанта.

Значение V_a измеряется для каждого из не менее чем трёх значений P/P_o.
Тогда значение БЭТ

$$\frac{1}{[V_a(\frac{P}{P_0}-1)]}$$

схематически выводится из значения P/P_o согласно уравнению (1). Этот график должен иметь, как правило, вид прямой линии при приблизительном диапазоне колебания относительного давления от 0,05 до 0,3. Полученные данные считаются приемлемыми, если коэффициент корреляции, r, линейной регрессии составляет не менее 0,9975; то есть r^2 составляет не менее 0,995. На получающемся линейном графике кривая, равная $(C - 1)/V_mC$, и точка пересечения, равная $1/V_mC$, оцениваются при помощи метода анализа линейной регрессии. Исходя из данных значений, V_m рассчитывают как *1/(кривая+точка пересечения),* в то время как *C* рассчитывают как *(кривая/точка пересечения)+1*. Исходя из того, что таким способом определяется значение V_m, удельная площадь поверхности, S, в $m^2 \cdot g^{-1}$, рассчитывается согласно уравнению:

$$S = \frac{V_m N_a}{m \cdot 22400}, \quad (2)$$

где:

N - Число Авогадро ($6{,}023 \times 10^{23}$ моль$^{-1}$);

a - полезная площадь поперечного сечения одной молекулы адсорбированного вещества, в квадратных метрах (0,162 нм^2 для азота и 0,195 нм^2 для криптона);

m - масса испытуемого порошка, г;

22400 - объём, занимаемый газом адсорбатом при СТД, учитывающий незначительное отклонение от нормы, мл.

II.2. ОДНОТОЧЕЧНОЕ ИЗМЕРЕНИЕ

Как правило, для определения удельной площади поверхности методом динамического потока адсорбции газа (*Метод 1*) или методом объёмного анализа газовой адсорбции (*Метод 2*) требуются как минимум три измерения V_a, каждое при различных значениях P/P_o. Однако, при определенных, описанных ниже условиях, приемлемо определять удельную площадь поверхности порошка на основании единственного значения V_a, измеренного при единственном значении P/P_o, таком как 0,300 (что соответствует 0,300 молям азота или 0,001038 молям фракции криптона), используя следующее уравнение для расчёта V_m.

$$V_m = V_a\left(1 - \frac{P}{P_0}\right) \quad (3)$$

Удельная площадь поверхности рассчитывается на основании значения V_m согласно уравнению (2), приведенному выше.

Одноточечный метод может применяться непосредственно на сериях образцов порошка определённого материала, для которого константа материала *C* намного выше, чем единица. Эти обстоятельства проверяются путём сравнения значений удельной площади поверхности, определяемых одноточечным методом со значениями, определяемыми многоточечным методом, для серии образцов порошка. Большое сходство между значениями, определёнными при помощи одноточечного и многоточечного методов, позволяет предполагать, что *1/C* приближается к нулю.

Одноточечный метод может применяться косвенно для ряда сходных образцов порошка, для которых константа материала *C* не является бесконечной, но может считаться инвариантной. При этих обстоятельствах погрешность, связанная с применением одноточечного метода, может быть уменьшена или устранена путём

использования многоточечного метода для оценки *C* одного из образцов серии в соответствии с БЭТ, согласно которому *C* рассчитывается как *(1+кривая/точка пересечения)*. Тогда V_m рассчитывается на основании единственного значения V_a, измеряемого при единственном значении P/P_o согласно уравнению:

$$V_m = V_a\left(\frac{P_0}{P} - 1\right)\cdot\left[\frac{1}{c} + \frac{c-1}{c}\cdot\left(\frac{P}{P_0}\right)\right] \quad (4)$$

Удельная площадь поверхности рассчитывается на основании значения V_m согласно уравнению (2), приведенному выше.

III. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МЕТОДИКИ

В данном разделе описываются методы, используемые для подготовки образца, метод динамического потока адсорбции газа *(Метод 1)* и метод объёмного анализа адсорбции газа *(Метод 2).*

III. 1. ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦА

III.1.1. Дегазация

Перед определением удельной площади поверхности образца необходимо удалить газы и пары, которые могли адсорбироваться на поверхности после производства и во время испытания, использования и хранения. Если дегазация не проведена, удельная площадь поверхности может быть меньше или меняться, так как промежуточная площадь поверхности покрывается молекулами ранее адсорбировавшихся газов или паров. Крайне важно соблюдать условия дегазации для обеспечения требуемой точности и тщательности измерений удельной площади поверхности фармацевтических лекарственных средств по причине чувствительности поверхности материалов.

Условия. Подтверждением того, что условия дегазации соблюдены, является воспроизведение графика БЭТ, постоянная масса испытуемого порошка и отсутствие физических или химических изменений в испытуемом порошке.

Условия дегазации, определяемые температурой, давлением и временем, должны выбираться таким образом, чтобы изначальная поверхность твёрдого вещества воспроизводилась максимально точно. Дегазация большого количества веществ достигается при помощи вакуума или путём очистки образца в токе инертного, сухого газа. Иногда применяются повышенные температуры для повышения скорости очистки поверхности от загрязняющих веществ. Дегазация путём нагревания образца порошка может изменить природу поверхности, поэтому данную процедуру не следует выполнять, если только нет особых указаний.

Если нагревание применяется, рекомендованная температура и время дегазации должны быть настолько малы, чтобы возможно было достичь воспроизводимых высоких показателей измерения удельной площади поверхности за приемлемый интервал времени. Для дегазации чувствительных образцов применяются другие методы дегазации, такие как цикличный метод десорбции и адсорбции.

III.1.2. Адсорбат

Стандартным методом является адсорбция азота при температуре жидкого азота.

Для порошков с низкой удельной площадью поверхности (<1 $m^2 \cdot g^{-1}$) пропорция адсорбции является низкой и в таких случаях предпочтительно использовать

криптон при температуре жидкого азота, поскольку низкое давление пара этого газа значительно уменьшает погрешность.

Все используемые газы должны быть сухими.

III.1.3. Количество образца

Точно взвешенное количество испытуемого порошка измельчают таким образом, чтобы общая поверхность образца составляла не менее 1 $м^2$, если в качестве адсорбата используется азот и 0,5 $м^2$, если в качестве адсорбата используется криптон.

III.2. ИЗМЕРЕНИЯ

Так как количество адсорбируемого газа при соответствующем давлении имеет тенденцию к увеличению при понижении температуры, измерение адсорбции, как правило, производятся при низкой температуре.

Измерения производятся при температуре 196°С, точке кипения жидкого азота.

III.2.1. Метод 1: метод динамического потока

III.2.1.1. *Характеристика метода.*

При методе динамического потока (см. Рисунок 2.9.26.-1) рекомендуемым газом адсорбатом является сухой азот или криптон; гелий же используется в качестве газа разбавителя, который не адсорбируется при рекомендуемых условиях.

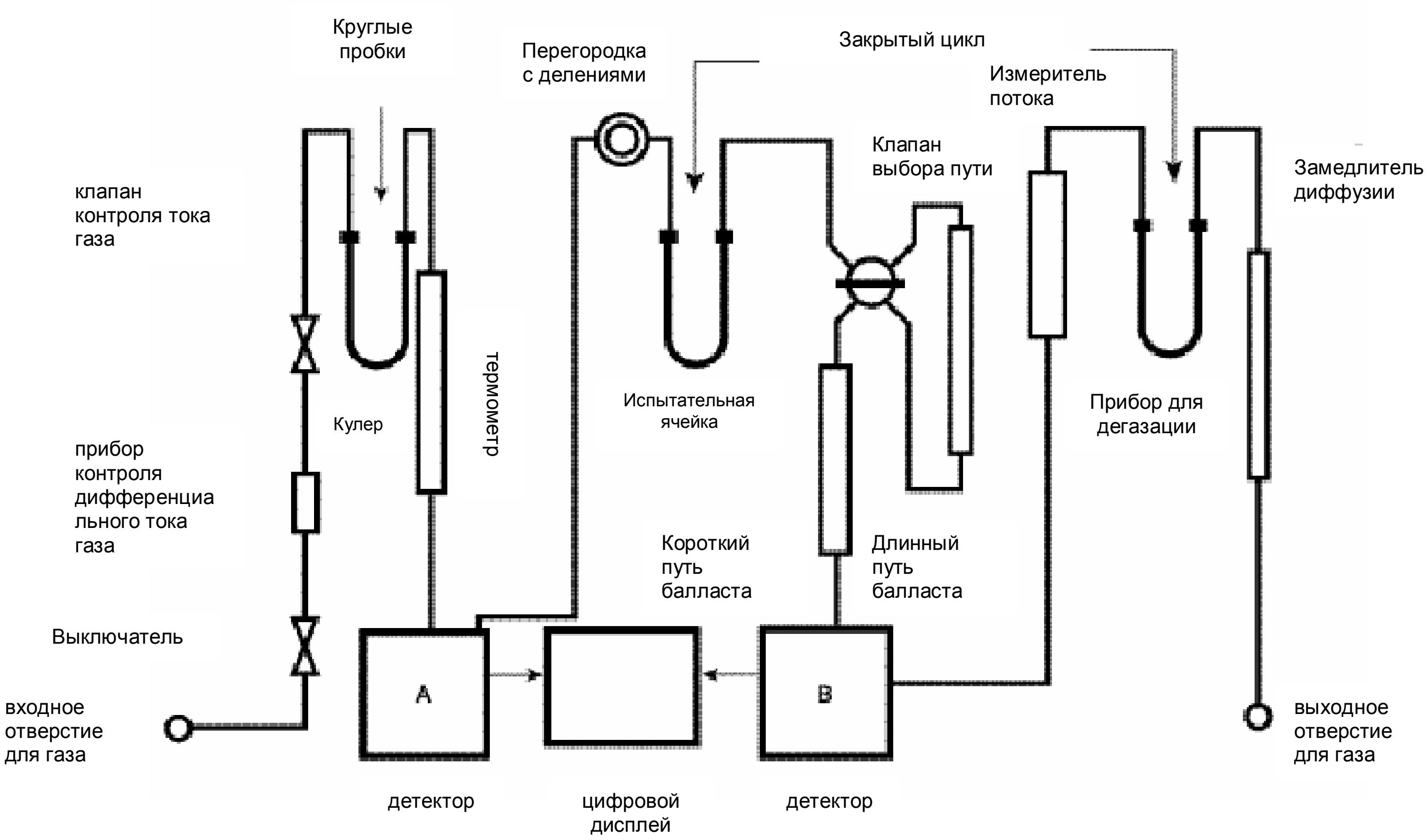


Рисунок 2.9.26.-1. – Схема прибора при использовании метода динамического потока

Если диапазон P/P_o колеблется в пределах от 0,05 до 0,30, требуются как минимум три смеси соответствующего газа адсорбата с гелием.

Детектор-интегратор должен обеспечивать сигнал, приблизительно пропорциональный объёму проходящего через него газа при заданных условиях температуры и давления. Для этой цели одним из многих подходящих видов приборов является детектор теплопроводимости с электронным интегратором. Должны определяться минимум три значения в рекомендуемом диапазоне P/ P_o от 0,05 до 0,30.

III. 2.1.2. *Процедура*

Определённую смесь газов, как правило, азота и гелия, пропускают через ячейку теплопроводимости, потом через образец и снова через ячейку теплопроводимости, а затем через записывающий потенциометр.

Погружают ячейку с образцом в жидкий азот, образец адсорбирует жидкий азот из подвижной фазы. Изменение теплопроводимости ячейки и импульс регистрируется записывающим прибором.

Изымают образец из охладителя; определяют равный по площади пик десорбции и противоположный ему пик адсорбции. Так как пик десорбции определяется легче, чем пик адсорбции, именно он и используется для расчётов.

Для проведения калибровки вводят достаточное количество воздуха в систему для получения величины пика сходной с пиком десорбции и рассчитывают пропорцию газа, адсорбируемого на единицу пика площади (вместо азота может использоваться воздух, так как они имеют одинаковую теплопроводимость).

Используют смесь азота и гелия для одноточечного метода и несколько таких смесей или предварительно смешанные два потока газа для многоточечного метода.

Расчёты производят так же, как и при методе объёмного анализа.

III.2.2. Метод 2: метод объёмного анализа

III. 2.2.1. *Характеристика метода*

При методе объёмного анализа (см. Рисунок 2.9.26.-2), рекомендуемым газом адсорбатом является азот, который помещается в разряженное пространство над предварительно дегазированным образцом порошка, чтобы обеспечить определенное давление, *P*, газа при соприкосновении с поверхностью образца. Использование газа разбавителя, например, гелия не является обязательным, хотя гелий может применяться для других целей, таких как измерение объёма пустот.

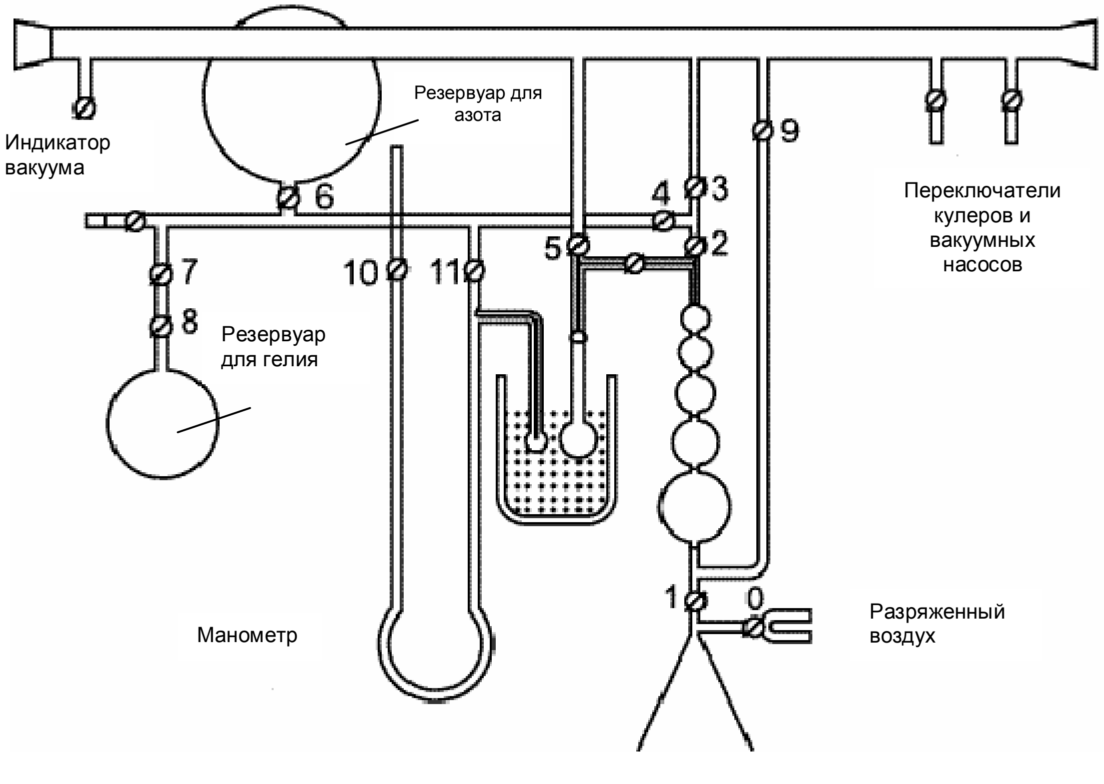


Рисунок 2.9.26.-2. – Схема прибора при использовании метода объёмного анализа

Так как применяется только чистый газ адсорбат вместо смеси газов, при этом методе удаётся избежать интерферирующих эффектов, возникающих при термальной диффузии.

III.2.2.2. *Процедура*

Помещают небольшое количество сухого азота в пробирку с образцом, чтобы предотвратить загрязнение чистой поверхности, убирают пробирку, закрывают пробкой и взвешивают. Вычисляют массу образца. Присоединяют пробирку к прибору для проведения объёмного анализа. Аккуратно извлекают образец при давлении 2,66 Па и менее.

Если принцип действия прибора требует измерения объёма пустот пробирки, например, путём подачи неадсорбированного газа (например, гелия) данная процедура выполняется после извлечения образца при давлении 2,66 Па и менее. Затем измеряется адсорбция азота, как указано ниже.

Поднимают сосуд Дьюара, содержащий жидкий азот при температуре 196°C, до определённой точки испытуемой ячейки. Добавляют необходимое количество азота до обеспечения величины относительного давления P/P_o 0,10±0,02. Измеряют адсорбированный объём V_a. Повторяют измерение V_a при значениях P/P_o, 0,20±0,02 и 0,30 ± 0,02.

Проводят не менее трех измерений. Могут производиться дополнительные измерения, особенно в тех редких случаях, когда достигается нелинейность при значении P/P_o близком к 0,3. Так как нелинейность часто достигается при P/P_o ниже 0,05, данные значения не рекомендуется принимать в расчёт. Определение линейности, обработка данных и расчёт удельной площади поверхности образца описаны выше.

IV. СТАНДАРТНЫЕ МАТЕРИАЛЫ.

Периодически необходимо проверять работу прибора, используя соответствующие эталонные материалы с известной площадью поверхности, которые должны иметь удельную площадь поверхности сходную с площадью поверхности испытуемого образца.

2.9.27. ОДНОРОДНОСТЬ МАССЫ ОДНОЙ ДОЗЫ ВЫСВОБОЖДЕННОЙ ИЗ МНОГОДОЗОВОГО КОНТЕЙНЕРА

Данное испытание предназначено для оральных лекарственных форм, таких как гранулы, порошки и жидкости для орального применения, выпускаемые в многодозовых контейнерах, снабженных встроенным дозирующим устройством.

Взвешивают индивидуально 20 доз, изъятых из одного или более контейнеров при помощи встроенного дозирующего устройства. Определяют массу каждой индивидуальной дозы и вычисляют среднюю массу. Масса не более двух индивидуальных доз может иметь отклонение более чем 10 % от средней массы и ни одна масса индивидуальной дозы не может иметь отклонение более 20 %.

2.9.28. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МАССЫ ИЛИ ОБЪЕМА СОДЕРЖИМОГО КОНТЕЙНЕРА ДЛЯ ЖИДКИХ И МЯГКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Данное испытание предназначено для испытания жидких (растворы, эмульсии и суспензии) и мягких лекарственных средств, выпускаемые в однодозовых контейнерах, содержимое которых используется частично.

ЖИДКИЕ ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА

Освобождают как можно полнее один контейнер и определяют массу или объём его содержимого соответствующим методом. Если содержимым являются эмульсии или суспензии, перед проведением испытанием контейнер встряхивают. Масса или объём содержимого должны быть не менее, указанного на этикетке.

МЯГКИЕ ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА

Освобождают как можно полнее один контейнер. Масса содержимого контейнера должна быть не менее, указанной на этикетке.

3.1. МАТЕРИАЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА КОНТЕЙНЕРОВ

Материалы, описанные ниже, используются для производства контейнеров для фармацевтического использования. Материалы, не описанные в Фармакопее, могут использоваться только после их утверждения в каждом конкретном случае компетентным уполномоченным органом.

3.1.1. МАТЕРИАЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА КОНТЕЙНЕРОВ ДЛЯ ЧЕЛОВЕЧЕСКОЙ КРОВИ И КОМПОНЕНТОВ КРОВИ

ПРИМЕЧАНИЕ: о материалах на основе поливинилхлорида, используемых при производстве контейнеров для водных растворов для внутривенного введения - см. Раздел 3.1.14.

Пластиковые контейнеры, используемые для сбора, хранения, обработки, введения крови и ее компонентов, могут быть изготовлены из одного или нескольких полимеров с использованием добавок, если это необходимо.

Если контейнер или часть его изготовлена из материалов, описанных в статье Фармакопеи, то качество этих материалов контролируется методами, описанными в данном разделе (*Раздел 3.1.1.1. Материалы на основе пластифицированного поливинилхлорида, используемые для производства контейнеров для человеческой крови и ее компонентов).*

В обычных условиях разрешается использование материалов и контейнеров из этих материалов, не выделяющих мономеров или других веществ, вредно воздействующих или вызывающих аномальные изменения крови или компонентов крови.

3.1.1.1. МАТЕРИАЛЫ НА ОСНОВЕ ПЛАСТИФИЦИРОВАННОГО ПОЛИВИНИЛХЛОРИДА, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА КОНТЕЙНЕРОВ ДЛЯ ЧЕЛОВЕЧЕСКОЙ КРОВИ И ЕЕ КОМПОНЕНТОВ

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Материалы на основе пластифицированного поливинилхлорида представляют собой высокомолекулярные полимеры, полученные полимеризацией винилхлорида, и содержат не менее 55 % поливинилхлорида и различные добавки.

Свойства материалов на основе пластифицированного поливинилхлорида, используемых для производства контейнеров для человеческой крови и ее компонентов, определяются природой и соотношением веществ, из которых они получены.

ПРОИЗВОДСТВО

Материалы на основе пластифицированного поливинилхлорида получают методами полимеризации, гарантирующими остаточное содержание винилхлори-

да менее 1 ppm. Данный метод должен быть валидирован для получения продукта полимеризации, отвечающего следующим требованиям:

Винилхлорид. Не более 1 ppm. Определение проводят методом парофазной газовой хроматографии *(2.2.28)*, используя в качестве внутреннего стандарта *эфир Р.*

Раствор внутреннего стандарта. К 20,0 мл *диметилацетамида Р* с помощью микрошприца добавляют 10 мкл *эфира Р*, погружая конец иглы в растворитель. Непосредственно перед использованием разбавляют раствор *диметилацетамидом Р* в 1000 раз.

Испытуемый раствор. Во флакон вместимостью 50 мл помещают 1,000 г испытуемого материала и прибавляют 10,0 мл раствора внутреннего стандарта. Герметично закрывают флакон пробкой. Встряхивают, избегая контакта жидкости с пробкой. Помещают флакон на водяную баню при температуре (60±1)^{0}С и выдерживают в течение 2 ч.

Основной раствор винилхлорида. Готовят в вытяжном шкафу. Во флакон вместимостью 50 мл помещают 50,0 мл *диметилацетамида Р*, герметично закрывают пробкой и взвешивают с точностью до 0,1 мг. Наполняют полиэтиленовый или полипропиленовый шприц вместимостью 50 мл газообразным *винилхлоридом Р*, оставляют шприц в контакте с газом в течение 3 мин, затем газ удаляют и снова наполняют шприц 50,0 мл газообразного *винилхлорида Р.* Присоединяют к шприцу гиподермальную иглу и уменьшают объем раствора в шприце до 25 мл. Медленно вводят оставшиеся 25 мл винилхлорида во флакон, осторожно встряхивая и избегая контакта жидкости с иглой. Опять взвешивают флакон. Увеличение массы должно составлять около 60 мг (1 мкл раствора содержит около 1,2 мкг винилхлорида). Оставляют на 2 ч. Затем хранят основной раствор в холодильнике.

Эталонный раствор винилхлорида. К 1 объему основного раствора винилхлорида прибавляют 3 объема *диметилацетамида Р*.

Растворы сравнения. В 6 одинаковых флаконов вместимостью 50 мл помещают по 10,0 мл раствора внутреннего стандарта. Флаконы герметично закрывают пробками. В 5 колб с помощью микрошприца прибавляют соответственно 1 мкл, 2 мкл, 3 мкл, 5 мкл и 10 мкл стандартного раствора винилхлорида. Полученные таким образом 6 растворов содержат соответственно 0 мкг, около 0,3 мкг, 0,6 мкг, 0,9 мкг, 1,5 мкг и 3 мкг винилхлорида. Встряхивают, избегая контакта жидкости с пробкой. Помещают колбы на водяную баню при температуре (60±1)^{0}С и выдерживают в течение 2 ч.

Условия хроматографирования:

- колонка из нержавеющей стали длиной 3 м, с внутренним диаметром 3 мм, заполненная сорбентом *диатомит силанизированный для газовой хроматографии Р,* импрегнированным 5 % *(м/м) диметилстеариламида Р* и 5 % *(м/м) макроголя 400 Р*;
- газ–носитель – *азот для хроматографии Р*; скорость газа–носителя – 30 мл/мин;
- детектор пламенно-ионизационный;
- температура колонки – 45^{0}С;

- температура блока ввода проб – 100^{0}С;
- температура детектора – 150^{0}С.

Хроматографируют по 1 мл паровой фазы из каждого флакона. Рассчитывают содержание винилхлорида.

Добавки

В полимер вводят определенное количество добавок для оптимизации их химических, физических и механических свойств с целью дальнейшего использования по назначению. Все добавки выбирают из нижеследующего перечня, который определяет для каждого вещества максимально допустимое его содержание:

- не более 40 % ди(2-этилгексил)фталата (добавка к пластмассе 01);
- не более 1 % цинка октаноата (цинка 2-этилгексаноата) (добавка к пластмассе 02);
- не более 1 % кальция стеарата или цинка стеарата или не более 1 % смеси этих веществ;
- не более 1 % N,N'-диацилэтилендиаминов (добавка к пластмассе 03);
- не более 10 % одного из следующих эпоксидированных масел или не более 10 % смеси двух компонентов:
- эпоксидированное соевое масло (добавка к пластмассе 04) с содержанием кислорода в эпоксидной группе 6-8 % и кислотным числом не более 6;
- эпоксидированное льняное масло (добавка к пластмассе 05) с содержанием кислорода в эпоксидной группе не более 10 % и йодным числом не более 7;

В полимере могут быть определены очень малые количества антиоксидантов, добавленные к винилхлориду мономеру. В полимер антиоксиданты не вводят.

В качестве красителя может быть использован только ультрамарин синий.

Поставщик материала несет ответственность за то, чтобы качественный и количественный состав типового образца соответствовал качественному и количественному составу каждой произведенной серии.

ОПИСАНИЕ

Бесцветный или бледно – желтый порошок, шарики, гранулы или, после трансформации, полупрозрачные пластинки разной толщины со слабым запахом. При сжигании выделяется густой, черный дым.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ

Если необходимо, образцы испытуемого материала разрезают на части с максимальной длиной стороны не более 1 см.

К 2,0 г испытуемого материала прибавляют 200 мл *эфира, свободного от пероксидов Р* и нагревают с обратным холодильником в течение 8 ч. Отделяют осадок В от раствора А фильтрованием. Выпаривают раствор А до сухого остатка под вакуумом на водяной бане при температуре 30^{0}С. Остаток растворяют в 10 мл *толуола Р* (раствор А1). Осадок В растворяют в 60 мл *этиленхлорида Р*, нагревая на водяной бане с обратным холодильником. Фильтруют. Полученный рас-

твор по каплям и при интенсивном встряхивании прибавляют к 600 мл *гептана Р*, нагретого почти до кипения. Коагулят В1 и органический раствор разделяют горячим фильтрованием. Охлаждают последний, отделяют образующийся осадок В2 и фильтруют через стеклянный фильтр (40).

А. Коагулят В1 растворяют в 30 мл *тетрагидрофурана Р* и прибавляют небольшими порциями при встряхивании 40 мл *этанола Р*. Отделяют осадок В3 фильтрованием и сушат в вакууме над *фосфора (V) оксидом Р* при температуре, не превышающей 50^{0}С. Растворяют несколько миллиграммов осадка В3 в 1 мл *тетрагидрофурана Р*, помещают несколько капель полученного раствора на диск натрия хлорида и выпаривают досуха в сушильном шкафу при температуре (100-105)^{0}С. Инфракрасный спектр *(2.2.24)* испытуемого материала сравнивают со спектром *поливинилхлорида ФСО*.

В. Сравнивают инфракрасный спектр *(2.2.24)* осадка С, полученного в испытании на добавки к пластмассе 01, 04 и 05, со спектром *добавки к пластмассе 01 ФСО.*

ИСПЫТАНИЯ

Если необходимо, образцы испытуемого материала разрезают на части с максимальной длиной стороны не более 1 см.

Раствор S1. 5,0 г испытуемого материала помещают в колбу для сжигания. Прибавляют 30 мл *кислоты серной Р* и нагревают до получения черной, сиропообразной массы. Охлаждают и прибавляют 10 мл *водорода пероксида раствора концентрированного Р*. Осторожно нагревают. Охлаждают и добавляют 1 мл *водорода пероксида раствора концентрированного Р*; повторяют поочередно выпаривание и добавление раствора водорода пероксида до получения бесцветной жидкости. Уменьшают объем раствора до 10 мл. Охлаждают и доводят объем до 50,0 мл *водой Р*.

Раствор S2. 25,0 г испытуемого материала помещают в колбу из боросиликатного стекла. Прибавляют 500 мл *воды для инъекций Р* и закрывают горло колбы стаканом из боросиликатного стекла. Нагревают в автоклаве при температуре (121±2)^{0}С в течение 20 мин. Охлаждают раствор и декантируют. Доводят объем раствора *водой для инъекций Р* до 500 мл.

Внешний вид раствора S2. Раствор S2 должен быть прозрачным *(2.2.1)* и бесцветным *(2.2.2, Метод II)*.

Кислотность или щелочность. К 100 мл раствора S2 прибавляют 0,15 мл *раствора BRP индикатора Р*. Для изменения окраски раствора на синюю должно потребоваться не более 1,5 мл *0,01 М раствора натрия гидроксида*. К 100 мл раствора S2 прибавляют 0,2 мл *раствора метилового оранжевого Р*. Для изменения желтой окраски раствора на оранжевую должно потребоваться не более 1,0 мл *0,01 М раствора кислоты хлористоводородной*.

Оптическая плотность *(2.2.25)*. 100,0 мл раствора S2 выпаривают досуха. Остаток растворяют в 5,0 мл *гексана Р*. Оптическая плотность раствора в диапазоне длин волн от 250 нм до 310 нм не должна превышать 0,25.

Восстановители. *Испытание проводят в течение 4 ч после приготовления раствора S2*. К 20,0 мл раствора S2 прибавляют 1 мл *кислоты серной разведенной Р* и 20,0 мл *0,002 М раствора калия перманганата*. Кипятят с обратным холодильником в течение 3 мин и немедленно охлаждают. Прибавляют 1 г *калия йодида Р* и немедленно титруют раствор *0,01 М раствором натрия тиосульфата*, используя в качестве индикатора 0,25 мл *раствора крахмала Р*. Параллельно проводят контрольный опыт, используя 20 мл *воды для инъекций Р*. Разность между объемами титранта не должна превышать 2,0 мл.

Первичные ароматические амины. К 2,5 мл раствора А1, полученного при проведении идентификации, прибавляют 6 мл *воды Р* и 4 мл *0,1 М раствора кислоты хлористоводородной*. Интенсивно встряхивают и удаляют верхний слой. К водному слою прибавляют 0,4 мл свежеприготовленного раствора 10 г/л *натрия нитрита Р*. Перемешивают и оставляют для настаивания в течение 1 мин. Прибавляют 0,8 мл раствора 25 г/л *аммония сульфамата Р*, оставляют для настаивания в течение 1 мин, затем прибавляют 2 мл раствора 5 г/л *нафтилэтилендиамина дигидрохлорида Р*. Через 30 мин окрашивание полученного раствора должно быть не более интенсивным, чем окрашивание стандарта, приготовленного параллельно аналогичным образом, но с использованием вместо водного слоя смеси 1 мл раствора 0,01 г/л *нафтиламина Р* в *0,1 М растворе кислоты хлористоводородной*, 5 мл *воды Р* и 4 мл *0,1 М раствора кислоты хлористоводородной* (20 ppm).

Добавки к пластмассе 01, 04 и 05. Определение проводят методом тонкослойной хроматографии *(2.2.27)*, используя в качестве неподвижной фазы *ТСХ пластину со слоем силикагеля GF_{254} Р* (толщиной 1 мм).

Растворы сравнения. Готовят растворы 0,1 мг/мл *добавки к пластмассе 01 ФСО*, *добавки к пластмассе 04 ФСО* и *добавки к пластмассе 05 ФСО*, соответственно, в *толуоле Р*.

На линию старта хроматографической пластины в виде полосы размером 30 мм × 3 мм наносят 0,5 мл раствора А1, полученного при проведении идентификации. Наносят на пластину по 5 мкл каждого из растворов сравнения. Помещают пластину в хроматографическую камеру, содержащую в качестве подвижной фазы *толуол Р*. Когда расстояние, пройденное подвижной фазой от линии старта, составит 15 см, пластину вынимают, осторожно высушивают. Анализируют в УФ – свете при длине волны 254 нм, определяя положение зоны, соответствующей добавке к пластмассе 01 (R_f около 0,4). Собирают силикагель с этой зоны и встряхивают с 40 мл *эфира Р* в течение 1 мин. Фильтруют, промывают фильтр двумя порциями, каждая по 10 мл *эфира Р*, добавляют их к фильтрату и выпаривают досуха. Масса остатка С не должна превышать 40 мг.

Обрабатывают пластину парами йода в течение 5 мин. Анализируют хроматограмму, определяя положение зоны, соответствующей добавкам к пластмассе 04 и 05 (R_f =0). Собирают силикагель с данной зоны. Аналогично собирают с идентичной по размеру зоны силикагель для контрольного опыта. Раздельно встряхивают оба образца в течение 15 мин с 40 мл *метанола Р*. Фильтруют, промывают фильтр двумя порциями, каждая по 10 мл, *метанола Р*, добавляя их к фильтрату, и выпаривают досуха. Разность между массами сухих остатков не должна превышать 10 мг.

Добавка к пластмассе 03. Осадок В2, полученный при проведении идентификации и находящийся на предварительно взвешенном стеклянном фильтре (40), промывают *этанолом Р*. Фильтр высушивают до постоянной массы над *фосфора (V) оксидом Р* и взвешивают. Масса остатка не должна превышать 20 мг.

Инфракрасный спектр *(2.2.24)* остатка должен соответствовать спектру *добавки к пластмассе 03 ФСО*.

Барий. Не более 5 ppm Ba. Определение проводят методом атомно-эмиссионной спектрометрии в среде аргона *(2.2.22, Метод I)*.

Испытуемый раствор. 1,0 г испытуемого материала прокаливают в кварцевом тигле. Остаток растворяют в 10 мл *кислоты хлористоводородной Р* и выпаривают досуха на водяной бане. Полученный остаток растворяют в 20 мл *0,1 М раствора кислоты хлористоводородной*.

Раствор сравнения. Раствор, содержащий 0,25 ppm бария, приготовленный разбавлением *эталонного раствора бария (50 ppm Ba) Р 0,1 М раствором кислоты хлористоводородной*.

Определение проводят, измеряя интенсивность светоиспускания бария при длине волны 455,40 нм, регулируя спектральный фон на уровне 455,30 нм.

Проверяют отсутствие бария в используемой кислоте хлористоводородной.

Кадмий. Не более 0,6 ppm Cd. Определение проводят методом атомно-абсорбционной спектрометрии *(2.2.23, Метод I).*

Испытуемый раствор. Выпаривают досуха 10 мл раствора S1. Остаток растворяют в 5 мл 1 % (*об/об*) раствора *кислоты хлористоводородной Р*, фильтруют и доводят объем фильтрата тем же растворителем до 10,0 мл.

Растворы сравнения. Растворы сравнения готовят разбавлением *эталонного раствора кадмия (0,1 % Cd) Р* 1 % (*об/об*) раствором *кислоты хлористоводородной Р*.

Измеряют оптическую плотность при длине волны 228,8 нм, используя в качестве источника излучения лампу с полым кадмиевым катодом и воздушно-ацетиленовое пламя.

Проверяют отсутствие кадмия в используемой кислоте хлористоводородной.

Кальций. Не более 0,07 % Ca. Определение проводят методом атомно-эмиссионной спектрометрии в среде аргона *(2.2.22, Метод I)*.

Испытуемый раствор. Используют испытуемый раствор, приготовленный для определения бария.

Раствор сравнения. Раствор, содержащий 50,0 ppm кальция, приготовленный разбавлением *эталонного раствора кальция (400 ppm Ca) Р 0,1 М раствором кислоты хлористоводородной*.

Определение проводят, измеряя интенсивность светоиспускания кальция при длине волны 315,89 нм, регулируя спектральный фон на уровне 315,60 нм.

Проверяют отсутствие кальция в используемой кислоте хлористоводородной.

Олово. Не более 20 ppm Sn. Определение проводят методом атомно-эмиссионной спектрометрии в среде аргона *(2.2.22, Метод I)*.

Испытуемый раствор. Непосредственно перед использованием разбавляют раствор S1 в 10 раз *водой Р*.

Раствор сравнения. Непосредственно перед использованием 2 мл *эталонного раствора олова (5 ppm Sn) Р* помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, содержащую 5 мл 20 % (*об/об*) раствора *кислоты серной Р* и доводят объем раствора *водой Р* до 50 мл.

Определение проводят, измеряя интенсивность светоиспускания олова при длине волны 189,99 нм, регулируя спектральный фон на уровне 190,10 нм.

Проверяют отсутствие олова в используемой кислоте хлористоводородной.

Цинк. Не более 0,2 % Zn. Определение проводят методом атомно-абсорбционной спектрометрии *(2.2.23, Метод I).*

Испытуемый раствор. Раствор S1 разбавляют в 100 раз *0,1 М раствором кислоты хлористоводородной*.

Растворы сравнения. Растворы сравнения готовят разбавлением *эталонного раствора цинка (100 ppm Zn) Р* 0,1 М раствором *кислоты хлористоводородной Р*.

Измеряют оптическую плотность при длине волны 213,9 нм, используя в качестве источника излучения лампу с полым цинковым катодом и воздушно-ацетиленовое пламя.

Проверяют отсутствие цинка в используемой кислоте хлористоводородной.

Тяжелые металлы *(2.4.8)*. К 10,0 мл раствора S1 прибавляют 0,5 мл *раствора фенолфталеина Р* и затем *натрия гидроксида раствор концентрированный Р* до получения бледно-розового окрашивания. Доводят объем раствора до 25 мл *водой Р*. 12 мл полученного раствора должны выдерживать испытание А на предельное содержание тяжелых металлов (50 ppm). Эталонный раствор готовят, используя *эталонный раствор свинца (2 ppm Pb) Р*.

Вещества, экстрагируемые водой. 50,0 мл раствора S2 выпаривают на водяной бане досуха и высушивают в сушильном шкафу при температуре (100-105)^{0}C до постоянной массы. Параллельно проводят контрольный опыт, используя 50,0 мл *воды для инъекций Р*. Масса сухого остатка не должна превышать 7,5 мг (0,3 %) с учетом контрольного опыта.

Количественное содержание

Определение проводят методом сжигания в колбе с кислородом *(2.5.10)*, используя 50,0 мг испытуемого материала. Продукты сжигания растворяют в 20 мл *1 М раствора натрия гидроксида*. К полученному раствору прибавляют 2,5 мл *кислоты азотной Р*, 10,0 мл *0,1 М раствора серебра нитрата*, 5 мл *раствора железа аммония сульфата Р2* и 1 мл *дибутилфталата Р*. Титруют раствор *0,05 М раствором аммония тиоцианата* до получения красновато-желтого окрашивания. Параллельно проводят контрольный опыт.

1 мл *0,1 М раствора серебра нитрата* соответствует 6,25 мг поливинилхлорида.

Кроме того, для стерильных и пустых контейнеров дополнительно проводят следующие испытания.

Раствор S3. Если испытуемый контейнер содержит раствор антикоагулянта, то контейнер опустошают, промывают внутри 250 мл *воды для инъекций Р* при температуре (20±1)^{0}C и перед приготовлением раствора S3 удаляют промывную жидкость. Помещают в контейнер *воду для инъекций Р* в объеме, соответствующем объему раствора антикоагулянта. Закрывают контейнер и нагревают в автоклаве таким образом, чтобы температура жидкости достигла 110^{0}C за 30 мин. После охлаждения доводят объем раствора *водой для инъекций Р* до номинального объема и гомогенизируют.

Раствор сравнения. *Воду для инъекций Р* нагревают в колбе из боросиликатного стекла в автоклаве при температуре 110^{0}C в течение 30 мин.

Восстановители. Непосредственно после приготовления, раствор S3 в объеме, соответствующем 8 % номинального объема контейнера, помещают в колбу из боросиликатного стекла. Параллельно в колбе из боросиликатного стекла готовят контрольный раствор, используя равный объем свежеприготовленного раствора сравнения. К каждому раствору прибавляют по 20,0 мл *0,002 М раствора калия перманганата* и 1 мл *кислоты серной разведенной Р*. Оставляют в защищенном от света месте на 15 мин. Затем добавляют к каждому раствору 0,1 г *калия йодида Р*. Оставляют в защищенном от света месте на 5 мин и немедленно титруют *0,01 М раствором натрия тиосульфата*, используя в качестве индикатора 0,25 мл *раствора крахмала Р*. Разность между объемами титрантов должна быть не более 2,0 мл.

Кислотность или щелочность. К объему раствора S3, соответствующему 4 % номинального объема контейнера, прибавляют 0,1 мл *раствора фенолфталеина Р*. Раствор остается бесцветным. Добавляют 0,4 мл *0,01 М раствора натрия гидроксида*. Раствор становится розовым. Добавляют 0,8 мл *0,01 М раствора кислоты хлористоводородной* и 0,1 мл *раствора метилового красного Р*. Раствор становится оранжево-красным или красным.

Хлориды *(2.4.4)*. 15 мл раствора S3 должны выдерживать испытание на предельное содержание хлоридов (0,4 ppm). Стандарт готовят, используя *эталонный раствор хлорида (5 ppm Cl) Р* и 13,8 мл *воды Р*.

Аммоний *(2.4.1)*. 5 мл раствора S3 доводят *водой Р* до 14 мл. Полученный раствор должен выдерживать испытание А на предельное содержание аммония (2 ppm).

Вещества, экстрагируемые водой. 100 мл раствора S3 выпаривают досуха на водяной бане. Высушивают в сушильном шкафу при температуре (100-105)^{0}С до постоянной массы. Параллельно проводят контрольный опыт, используя 100 мл раствора сравнения. Масса сухого остатка, полученного из раствора S3, не должна превышать 3 мг с учетом контрольного опыта.

Оптическая плотность *(2.2.25)*. Измеряют оптическую плотность раствора S3 в диапазоне длин волн от 230 нм до 360 нм относительно раствора сравнения. В области длин волн от 230 нм до 250 нм оптическая плотность не должна превышать 0,30. В области длин волн от 251 нм до 360 нм оптическая плотность не должна превышать 0,10.

Экстрагируемая добавка к пластмассе 01. В качестве экстрагента используют *спирт Р*, разбавленный *водой Р,* до получения относительной плотности *(2.2.5)* от 0,9389 до 0,9395, измеренной ареометром.

Основной раствор. 0,100 г *добавки к пластмассе 01 ФСО* растворяют в экстрагенте и доводят объем раствора тем же растворителем до 100,0 мл.

Стандартные растворы:
(a) 20,0 мл основного раствора доводят экстрагеном до объема 100,0 мл,
(b) 10,0 мл основного раствора доводят экстрагеном до объема 100,0 мл,
(c) 5,0 мл основного раствора доводят экстрагеном до объема 100,0 мл,
(d) 2,0 мл основного раствора доводят экстрагеном до объема 100,0 мл,
(e) 1,0 мл основного раствора доводят экстрагеном до объема 100,0 мл.

Измеряют оптическую плотность *(2.2.25)* стандартных растворов в максимуме поглощения при 272 нм относительно экстрагента и строят кривую зависимости оптической плотности от концентрации добавки к пластмассе 01.

Методика экстракции. Используя донорскую систему с иглой или адаптер, помещают в пустой контейнер экстрагент, предварительно нагретый в хорошо укупоренной таре до температуры 37^{0}С, в объеме, соответствующем половине номинального объема контейнера. Полностью удаляют из контейнера воздух и герметизируют донорскую систему. Погружают наполненный контейнер в горизонтальном положении в водяную баню, температура которой поддерживается на уровне (37±1)^{0}С в течение (60±1) мин без встряхивания. Вынимают контейнер из водяной бани, аккуратно переворачивают 10 раз и переносят содержимое в стеклянную колбу. Непосредственно после этого измеряют оптическую плотность раствора в максимуме при длине волны 272 нм относительно экстрагента.

По градуировочному графику определяют концентрацию добавки к пластмассе 01 в миллиграммах на 100 мл экстракта. Концентрация не должна превышать:
- 10 мг на 100 мл для контейнеров с номинальным объемом от 300 до 500 мл;
- 13 мг на 100 мл для контейнеров с номинальным объемом от 150 до 300 мл;
- 14 мг на 100 мл для контейнеров с номинальным объемом до 150 мл.

В случаях, если контейнер содержит раствор антикоагулянта, этот раствор должен соответствовать требованиям статьи «Антикоагулянты и консервирующие растворы для крови человека (0209)», а также требованиям следующего испытания.

Оптическая плотность *(2.2.25)*. Измеряют оптическую плотность раствора антикоагулянта в диапазоне длин волн от 250 нм до 350 нм относительно раствора антикоагулянта, идентичного по составу, но не находившемуся в контакте с пластмассой. Оптическая плотность в максимуме при длине волны 280 нм не должна превышать 0,5.

3.1.1.2. МАТЕРИАЛЫ НА ОСНОВЕ ПЛАСТИФИЦИРОВАННОГО ПОЛИВИНИЛХЛОРИДА ДЛЯ ТРУБОК, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В КОМПЛЕКТАХ ДЛЯ ПЕРЕЛИВАНИЯ КРОВИ И КОМПОНЕНТОВ КРОВИ

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Материалы на основе пластифицированного поливинилхлорида для трубок, используемых в комплектах для переливания крови и компонентов крови, содержат не менее 55% поливинилхлорида с ди(2-этил-гексил)фталатом (добавкой к пластмассе 01) в качестве пластификатора.

ПРОИЗВОДСТВО

Материалы на основе пластифицированного поливинилхлорида получают методами полимеризации, гарантирующими остаточное содержание винилхлорида менее 1 ppm. Данный метод должен быть валидирован для получения продукта, отвечающего следующим требованиям:

Винилхлорид. Не более 1 ppm. Определение проводят методом парофазной газовой хроматографии *(2.2.28)*, используя в качестве внутреннего стандарта *эфир Р.*

Раствор внутреннего стандарта. К 20,0 мл *диметилацетамида R* с помощью микрошприца добавляют 10 мкл *эфира Р*, погружая конец иглы в растворитель. Непосредственно перед использованием разбавляют раствор *диметилацетамидом Р* в 1000 раз.

Испытуемый раствор. Во флакон вместимостью 50 мл помещают 1,000 г испытуемого материала и прибавляют 10,0 мл раствора внутреннего стандарта. Герметично закрывают флакон пробкой. Встряхивают, избегая контакта жидкости с пробкой. Помещают флакон на водяную баню при температуре (60±1)^{0}С и выдерживают в течение 2 ч.

Основной раствор винилхлорида. Готовят в вытяжном шкафу. Во флакон вместимостью 50 мл помещают 50,0 мл *диметилацетамида Р*, герметично закрывают пробкой и взвешивают с точностью до 0,1 мг. Наполняют полиэтиленовый или полипропиленовый шприц вместимостью 50 мл газообразным *винилхлоридом Р*, оставляют шприц в контакте с газом в течение 3 мин, затем газ удаляют и снова наполняют шприц 50,0 мл газообразного *винилхлорида Р.* Присоединяют к шприцу гиподермальную иглу и уменьшают объем раствора в шприце до 25 мл. Медленно вводят оставшиеся 25 мл винилхлорида во флакон, осторожно встряхивая и избегая контакта жидкости с иглой. Опять взвешивают флакон; увеличение массы должно составлять около 60 мг (1 мкл раствора содержит около 1,2 мкг винилхлорида). Оставляют на 2 ч. Хранят основной раствор в холодильнике.

Эталонный раствор винилхлорида. К 1 объему основного раствора винилхлорида прибавляют 3 объема *диметилацетамида Р*.

Растворы сравнения. В 6 одинаковых флаконов вместимостью 50 мл помещают по 10,0 мл раствора внутреннего стандарта. Флаконы герметично закрывают пробками. В 5 флаконов прибавляют соответственно 1 мкл, 2 мкл, 3 мкл, 5 мкл и 10 мкл стандартного раствора винилхлорида. Полученные растворы содержат соответственно 0 мкг, около 0,3 мкг, 0,6 мкг, 0,9 мкг, 1,5 мкг и 3 мкг винилхлорида. Встряхивают, избегая контакта жидкости с пробкой. Помещают флаконы на водяную баню при температуре (60±1)^{0}С и выдерживают в течение 2 ч.

Условия хроматографирования:

- колонка из нержавеющей стали длиной 3 м, с внутренним диаметром 3 мм, заполненная сорбентом *диатомит силанизированный для газовой хроматографии Р,* импрегнированным 5 % *(м/м) диметилстеариламида Р* и 5 % *(м/м) макроголя 400 Р*;
- газ–носитель – *азот для хроматографии Р*; скорость газа–носителя – 30 мл/мин;
- детектор пламенно-ионизационный;
- температура колонки – 45^{0}С;
- температура блока ввода проб – 100^{0}С;
- температура детектора – 150^{0}С.

Хроматографируют по 1 мл паровой фазы из каждого флакона. Рассчитывают содержание винилхлорида.

Поставщик материала несет ответственность за то, чтобы качественный и количественный состав типового образца соответствовал качественному и количественному составу каждой произведенной серии.

ОПИСАНИЕ

Бесцветный или бледно – желтый порошок, шарики, гранулы или, после трансформации, полупрозрачные пластинки разной толщины со слабым запахом. При сжигании выделяется плотный, черный дым.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ

Если необходимо, образцы испытуемого материала разрезают на части с максимальной длиной стороны не более 1 см.

А. К 0,5 г испытуемого материала прибавляют 30 мл *тетрагидрофурана Р*. Нагревают при перемешивании на водяной бане в вытяжном шкафу в течение 10 мин. Материал полностью распадается. Прибавляют *метанол Р* по каплям при перемешивании. Образуется гранулированный осадок. Осадок отфильтровывают и сушат при температуре 60^{0}С. Исследуют осадок методом инфракрасной абсорбционной спектрометрии (*2.2.24.*). Растворяют 50 мг осадка в 2 мл *тетрагидрофурана Р* и наносят на предметное стекло. Сушат в сушильном шкафу при температуре 80^{0}С. Достают предметное стекло и помещают на подставку. Исследуют осадок методом инфракрасной абсорбционной спектрометрии (*2.2.24*), сравнивая со спектром *поливинилхлорида ФСО*.

В. Инфракрасный спектр *(2.2.24)* осадка, полученного в испытании «Добавка к пластмассе 01», соответствует спектру *добавки к пластмассе 01 ФСО*.

ИСПЫТАНИЯ

Если необходимо, образцы испытуемого материала разрезают на части с максимальной длиной стороны не более 1 см.

Раствор S1. Помещают 5,0 г испытуемого материала в колбу для сжигания. Прибавляют 30 мл *кислоты серной Р* и нагревают до получения черной, сиропообразной массы. Охлаждают и прибавляют 10 мл *водорода пероксида раствора концентрированного Р*. Осторожно нагревают. Охлаждают и прибавляют 1 мл *водорода пероксида раствора концентрированного Р*; повторяют поочередно нагревание и добавление раствора водорода пероксида до получения бесцветной жидкости. Уменьшают объем раствора до 10 мл. Охлаждают и доводят объем раствора до 50,0 мл *водой Р.*

Раствор S2. 25 г испытуемого материала помещают в колбу из боросиликатного стекла. Прибавляют 500 мл *воды Р* и закрывают горлышко колбы лабораторным стаканом из боросиликатного стекла. Нагревают в автоклаве при температуре (121±2)^{0}С в течение 20 мин. Охлаждают и декантируют раствор. Доводят объем раствора *водой Р* до метки.

Внешний вид раствора S2. Раствор S2 должен быть прозрачным (*2.2.1*) и бесцветным (*2.2.2, Метод II*).

Добавка к пластмассе 01. Исследование проводят методом тонкослойной хроматографии (*2.2.27*), используя *ТСХ пластину со слоем силикагеля G Р*.

Испытуемый раствор. К 2,0 г испытуемого материала прибавляют 200 мл *эфира, свободного от пероксидов Р* и нагревают с обратным холодильником в течение 8 ч. Разделяют осадок и раствор фильтрованием. Раствор выпаривают досуха на водяной бане при температуре 30^{0}С. Осадок растворяют в 10 мл *толуола Р*.

Раствор сравнения. Растворяют 0,8 г *добавки к пластмассе 01 ФСО* в *толуоле Р* и доводят объем раствора тем же растворителем до 10 мл.

На линию старта хроматографической пластины наносят в виде полосы размером 30 мм × 3 мм 0,5 мл испытуемого раствора и 5 мкл раствора сравнения. Пластину помещают в камеру с *толуолом Р*. Когда фронт растворителя пройдет 15 см от линии старта, пластину вынимают из камеры и аккуратно сушат на воздухе. Исследуют хроматограмму в УФ - свете при 254 нм и определяют положение зоны, соответствующей добавке к пластмассе 01. Собирают область силикагеля, соответствующую этой зоне, и взбалтывают с 40 мл *эфира Р*. Фильтруют, не допуская потерь, и выпаривают досуха. Масса осадка не должна превышать 40 мг.

Барий. Не более 5 ppm Ba. Определение проводят методом атомно-эмиссионной спектрометрии в среде аргона (*2.2.22, Метод I*).

Испытуемый раствор. 1,0 г испытуемого материала сжигают в кварцевом тигле. Остаток растворяют в 10 мл *кислоты хлористоводородной Р* и выпарива-

ют досуха на водяной бане. Остаток растворяют в 20 мл *0,1 М кислоты хлористоводородной*.

Раствор сравнения. Раствор, содержащий 0,25 ppm бария, приготовленный разбавлением *эталонного раствора бария (50 ppm Ba) Р 0,1 М раствором кислоты хлористоводородной.*

Измеряют интенсивность светоиспускания бария при длине волны 455,40 нм, регулируя спектральный фон на уровне 455,30 нм.

Проверяют отсутствие бария в используемой кислоте хлористоводородной.

Кадмий. Не более 0,6 ppm Cd. Определение проводят методом атомно-абсорбционной спектрометрии (*2.2.23, метод I*).

Испытуемый раствор. 10 мл раствора S1 выпаривают досуха. Остаток растворяют в 5 мл 1% раствора (*об/об*) *кислоты хлористоводородной Р,* фильтруют и доводят объем фильтрата тем же растворителем до 10,0 мл.

Раствор сравнения. Готовят разбавлением *эталонного раствора кадмия (0,1% Cd) Р 1% раствором (об/об) кислоты хлористоводородной Р.*

Измеряют оптическую плотность при 228,8 нм, используя в качестве источника излучения лампу с полым кадмиевым катодом и воздушно-ацетиленовое пламя.

Проверяют отсутствие кадмия в используемой кислоте хлористоводородной.

Олово. Не более 20 ppm Sn. Определение проводят методом атомно-эмиссионной спектрометрии в среде аргона (*2.2.22, Метод I*).

Испытуемый раствор. Раствор S1 разбавляют *водой Р* в 10 раз непосредственно перед использованием.

Раствор сравнения. 2 мл *эталонного раствора олова (5 ppm Sn) Р* помещают в колбу вместимостью 50 мл, содержащую 5 мл 20% (*об/об*) раствора *кислоты серной Р* и доводят объем раствора до 50 мл *водой Р* непосредственно перед использованием.

Измеряют интенсивность светоиспускания олова при длине волны 189,99 нм, регулируя спектральный фон на уровне 190, 0 нм.

Проверяют отсутствие олова в используемой кислоте серной.

Тяжелые металлы (*2.4.8*). К 10 мл раствора S1 прибавляют 0,5 мл *раствора фенолфталеина Р* и *натрия гидроксида раствор концентрированный Р* до появления бледно-розового окрашивания. Доводят объем раствора до 25 мл *водой Р*. 12 мл полученного раствора должны выдерживать испытание А на тяжелые металлы (50 ppm). Эталонный раствор готовят с использованием *эталонного раствора свинца (2 ppm Pb) Р*.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ

К 0,500 г испытуемого материала прибавляют 30 мл *тетрагидрофурана Р* и нагревают при перемешивании на водяной бане в вытяжном шкафу в течение 10 мин. Материал полностью растворяется. Прибавляют 60 мл *метанола Р* по каплям при перемешивании. Образуется гранулированный осадок поливинилхлорида. Оставляют для настаивания на несколько минут. Продолжают прибавление *метанола Р* до прекращения образования осадка. Осадок переносят на стеклянный фильтр (40), используя три небольшие порции *метанола Р* для количественного перенесения и промывания осадка. Высушивают фильтр и осадок при температуре 60^{0}С до постоянной массы и взвешивают.

Для стерильных комплектов дополнительно проводят следующие испытания.

Раствор S3. Делают замкнутую систему циркуляции из трех комплектов и сосуда из боросиликатного стекла вместимостью 300 мл. Присоединяют к сосуду термостат для поддержания температуры жидкости в сосуде (37±1)^{0}С. Прокачивают по системе 250 мл *воды для инъекций Р* в направлении, которое используется для переливания, в течение 2 ч со скоростью 1 л/час (например, используя перистальтический насос, присоединенный короткой частью подходящей силиконовой трубки). Собирают весь раствор и охлаждают.

Внешний вид раствора. Раствор S3 должен быть прозрачным (*2.2.1*) и бесцветным (*2.2.2, Метод II*).

Кислотность или щелочность. К 25 мл раствора S3 прибавляют 0,15 мл *раствора BRP индикатора Р*. Для изменения окраски раствора на синюю должно потребоваться не более 0,5 мл *0,01 М раствора натрия гидроксида*. К 25 мл раствора S3 прибавляют 0,2 мл *раствора метилового оранжевого Р*. Для изменения окраски раствора на желтую или оранжевую должно потребоваться не более 0,5 мл *0,01 М раствора кислоты хлористоводородной.*

Оптическая плотность (*2.2.25*). Оптическая плотность раствора S3 в области от 230 нм до 250 нм не должна превышать 0,30. Оптическая плотность раствора S3 в области от 251 нм до 360 нм не должна превышать 0,15.

Восстановители. *Испытание проводят в течение 4 ч после приготовления раствора S3.* К 20,0 мл раствора S3 прибавляют 1 мл *кислоты серной разведенной Р* и 20,0 мл *0,002 М раствора калия перманганата*. Кипятят в течение 3 мин и сразу охлаждают. Прибавляют 1 г *калия иодида Р* и титруют *0,01 М раствором натрия тиосульфата*, используя в качестве индикатора 0,25 мл *раствора крахмала Р*. Параллельно проводят контрольный опыт, используя 20 мл *воды для инъекций Р.* Разность между объемами титранта не должна превышать 2,0 мл.

Вещества, экстрагируемые водой. 50,0 мл раствора S3 выпаривают досуха на водяной бане и высушивают в сушильном шкафу при температуре от 100^{0}С до 105^{0}С до постоянной массы. Параллельно проводят контрольный опыт, используя 50,0 мл *воды для инъекций Р*. Масса сухого остатка не должна превышать 1,5 мг с учетом контрольного опыта.

3.1.3. ПОЛИОЛЕФИНЫ

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Полиолефины получают полимеризацией этилена или пропилена или сополимеризацией этих веществ с содержанием не более 25% высших гомологов (C_4-C_{10}), или карбоновых кислот или эфиров. Некоторые материалы могут представлять собой смесь полиолефинов.

ПРОИЗВОДСТВО

В полимер вводят некоторое количество добавок для оптимизации их химических, физических и механических свойств с целью обеспечения использования полимера по назначению. Добавки выбирают из нижеперечисленного списка, в котором для каждой добавки обозначен максимально возможный состав.

Полимеры могут содержать не более трех антиоксидантов, один или несколько смазывающих или антиадгезивных агентов, а также титана диоксид как средство, придающее непрозрачность, чтобы защитить материал от света.

- бутилгидрокситолуол (добавка к пластмассе 07) (не больше 0,125%);
- пентаэритритилтетракис[3-(3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидроксифенил)пропионат] (добавка к пластмассе 09) (не более 0,3%);
- 1,3,5-трис(3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидроксибензил)-s-триазин-2,4,6(1H, 3H, 5H)-трион (добавка к пластмассе 13) (не более 0,3%);
- октадецил 3-(3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидроксифенил)пропионат (добавка к пластмассе 11) (не более 0,3%);
- этиленбис[3,3-бис[3-(1,1-диметилэтил)-4-гидроксифенил]бутаноат] (добавка к пластмассе 08) (не более 0,3%);
- диоктадецилдисульфид (добавка к пластмассе 15) (не более 0,3%);
- 4,4',4'' - (2,4,6-триметилбензен-1,3,5-триилтрисметилен)трио[2,6-бис(1,1-диметилэтил)фенол] (добавка к пластмассе 10) (не более 0,3%);
- 2,2,'-бис (октадецилокси)-5,5'-спироби[1,3,2-диоксафосфинан] (добавка к пластмассе 14) (не более 0,3%);
- дидодецил 3,3,'-тиодипропионат (добавка к пластмассе 16) (не более 0,3%);
- диоктадецил 3,3' -тиодипропионат (добавка к пластмассе 17) (не более 0,3%);
- трис[2,4-бис(1,1-диметилэтил)фенил] фосфит (добавка к пластмассе 12) (не более 0,3%);
- добавка к пластмассе 18 (не более 0,1%);
- сополимер диметилсукцината и (4-гидрокси -2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-ил)этанол (добавка к пластмассе 22) (не более 0,3%);

Сумма перечисленных выше антиоксидантных добавок не должна превышать 0,3%.

- гидротальцит (не более 0,5%);
- алканамиды (не более 0,5%);
- алкенамиды (не более 0,5%);
- натрия алюмосиликат (не более 0,5%);
- кремния диоксид (не более 0,5%);
- натрия бензоат (не более 0,5%);

- эфиры или соли жирных кислот (не более 0,5%);
- натрия фосфат (не более 0,5%);
- вазелиновое масло (не более 0,5%);
- цинка оксид (не более 0,5%);
- тальк (не более 0,5%);
- магния оксид (не более 0,2%);
- кальция стеарат или цинка стеарат или их сумма (не более 0,5%);
- титана диоксид (не более 4%);

Поставщик материала несет ответственность за то, чтобы качественный и количественный состав типового образца соответствовал качественному и количественному составу каждой произведенной серии.

ОПИСАНИЕ

Порошок, шарики, гранулы или, после трансформации, полупрозрачные пластинки разной толщины, или контейнеры. Практически нерастворимы в воде, этаноле, гексане и метаноле, растворимы в горячих ароматических углеводородах. Размягчаются при температуре от 65^{0}С до 165^{0}С. При сжигании пламя окрашивается в синий цвет.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ

Если необходимо, образцы испытуемого материала разрезают на части с максимальной длиной стороны не более 1 см.

А. К 0,25 г испытуемого материала прибавляют 10 мл *толуола Р* и кипятят с обратным холодильником в течение 15 мин. Несколько капель полученного раствора помещают на диск натрия хлорида и выпаривают растворитель в сушильном шкафу при температуре 80^{0}С. Исследование проводят методом инфракрасной абсорбционной спектрометрии (*2.2.24*). Инфракрасный спектр исследуемого материала должен иметь максимумы при следующих волновых числах: 2920 см$^{-1}$, 2850 см$^{-1}$, 1475 см$^{-1}$, 1465 см$^{-1}$, 1380 см$^{-1}$, 1170 см$^{-1}$, 735 см$^{-1}$, 720 см$^{-1}$; полученный спектр должен соответствовать спектру типового образца. Если материал имеет форму пластин, идентификацию можно провести непосредственно на вырезанном фрагменте пластинки соответствующего размера.

В. Испытуемый материал должен выдерживать дополнительные испытания в зависимости от тех добавок, которые входят в его состав.

С. Около 20 мг испытуемого материала смешивают в платиновом тигле с 1 г *калия гидросульфата Р*, нагревают до полного расплавления и охлаждают. Добавляют 20 мл *кислоты серной разведенной Р*, аккуратно нагревают и фильтруют. К полученному фильтрату прибавляют 1 мл *кислоты фосфорной Р* и 1 мл *водорода пероксида раствора концентрированного Р.* Если испытуемый материал содержит титана диоксид, появляется оранжево-желтое окрашивание.

ИСПЫТАНИЯ

Если необходимо, образцы испытуемого материала разрезают на части с максимальной длиной стороны не более 1 см.

Раствор S1. *Раствор S1 используют в течение 4 ч после приготовления.* 25 г испытуемого материала помещают в колбу из боросиликатного стекла с притертой пробкой. Прибавляют 500 мл *воды для инъекций Р* и кипятят с обратным холодильником в течение 5 ч. Охлаждают и декантируют. Часть раствора S1 сохраняют для проведения испытаний на прозрачность и цветность. Остаток раствора фильтруют через стеклянный фильтр (16).

Раствор S2. 2,0 г испытуемого материала помещают в коническую колбу из боросиликатного стекла с притертой пробкой. Прибавляют 80 мл *толуола Р* и кипятят с обратным холодильником при постоянном перемешивании в течение 90 мин. Охлаждают до температуры 60^{0}С и прибавляют 120 мл *толуола Р* при постоянном перемешивании. Раствор фильтруют через стеклянный фильтр (16). Колбу и фильтр промывают 25 мл смеси *толуола Р – метанола Р* (40:60), присоединяют ее к фильтрату и доводят объем полученного раствора той же смесью растворителей до 250 мл. Готовят контрольный раствор.

Раствор S3. 100 г испытуемого материала помещают в коническую колбу из боросиликатного стекла с притертой пробкой и прибавляют 250 мл *0,1 М раствора кислоты хлористоводородной*. Кипятят с обратным холодильником при постоянном перемешивании в течение 1 ч. Охлаждают и декантируют раствор.

Внешний вид раствора S1. Раствор S1 должен быть прозрачным (*2.2.1*) и бесцветным (*2.2.2, Метод II*).

Кислотность или щелочность. К 100 мл раствора S1 прибавляют 0,15 мл *раствора BRP индикатора Р*. Для изменения окраски раствора на синюю должно потребоваться не более 1,5 мл *0,01 М раствора натрия гидроксида*. К 100 мл раствора S1 прибавляют 0,2 мл *раствора метилового оранжевого Р*. Для изменения окраски раствора на желтую или оранжевую должно потребоваться не более 1,0 мл *0,01 М раствора кислоты хлористоводородной.*

Оптическая плотность (*2.2.25*). Оптическая плотность раствора S1 в области от 220 нм до 340 нм не должна превышать 0,2.

Восстановители. К 20,0 мл раствора S1 прибавляют 1 мл *кислоты серной разведенной Р* и 20,0 мл *0,002 М раствора калия перманганата*. Кипятят с обратным холодильником в течение 3 мин и сразу охлаждают. Прибавляют 1 г *калия иодида Р* и сразу титруют *0,01 М раствором натрия тиосульфата* используя в качестве индикатора 0,25 мл *раствора крахмала Р*. Параллельно проводят контрольный опыт. Разность между объемами титранта не должна превышать 3,0 мл.

Вещества, растворимые в гексане. 10 г испытуемого материала помещают в коническую колбу из боросиликатного стекла с притертой пробкой вместимостью 250 мл. Прибавляют 100 мл *гексана Р* и кипятят с обратным холодильником в течение 4 ч при постоянном перемешивании. Охлаждают в ледяной бане и быстро фильтруют через стеклянный фильтр (16), поддерживая температуру раствора около 0^{0}С (время фильтрования должно быть менее 5 мин; для ускорения процесса, если необходимо, фильтрование проводят под давлением). 20 мл фильтрата помещают в высушенный до постоянной массы стакан из боросиликатного стекла и выпаривают на водяной бане. Остаток сушат в сушильном шкафу при температуре от 100^{0}С до 105^{0}С в течение 1 ч. Масса полученного остатка должна быть в

пределах 10% от массы остатка, полученного для типового образца, и не должна превышать 5%.

Экстрагируемый алюминий. Не более 1 ppm экстрагируемого Al. Определение проводят методом атомно-эмиссионной спектрометрии в атмосфере аргона *(2.2.22, Метод I)*.

Испытуемый раствор. Используют раствор S3.

Раствор сравнения. Готовят разбавлением *эталонного раствора алюминия (200 ppm Al) Р 0,1 М раствором кислоты хлористоводородной*.

Измеряют интенсивность светоиспускания алюминия при длине волны 396,15 нм, регулируя спектральный фон на уровне 396,25 нм.

Проверяют отсутствие алюминия в используемой кислоте хлористоводородной.

Экстрагируемый титан. Не более 1 ppm экстрагируемого Ti. Определение проводят методом атомно-эмиссионной спектрометрии в среде аргона *(2.2.22, Метод I).*

Испытуемый раствор. Используют раствор S3.

Раствор сравнения. Готовят разбавлением *эталонного раствора титана (100 ppm Ti) Р 0,1 М раствором кислоты хлористоводородной*.

Измеряют интенсивность светоиспускания титана при длине волны 336,12 нм, регулируя спектральный фон на уровне 336,16 нм.

Проверяют отсутствие титана в используемой кислоте хлористоводородной.

Экстрагируемый цинк. Не более 1 ppm экстрагируемого Zn. Определение проводят методом атомно-абсорбционной спектрометрии *(2.2.23, Метод I)*.

Испытуемый раствор. Используют раствор S3.

Раствор сравнения. Готовят разбавлением *эталонного раствора цинка (10 ppm Zn) Р 0,1 М раствором кислоты хлористоводородной*.

Измеряют оптическую плотность при длине волны 213,9 нм, используя в качестве источника излучения лампу с полым цинковым катодом и воздушно-ацетиленовое пламя.

Проверяют отсутствие цинка в используемой кислоте хлористоводородной.

Экстрагируемые тяжелые металлы *(2.4.8)*. 50 мл раствора S3 упаривают до объема около 5 мл на водяной бане и доводят *водой Р* до объема 20,0 мл. 12 мл полученного раствора должны выдерживать требования испытания А на тяжелые металлы (2,5 ppm). Эталонный раствор готовят с использованием 2,5 мл *эталонного раствора свинца (10 ppm Pb) Р*.

Сульфатная зола (*2.4.14*). Не более 1,0%. Определение проводят из 5,0 г испытуемого материала. Эта норма не распространяется на материалы, которые содержат титана диоксид как добавку, придающую непрозрачность материалу.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ ИСПЫТАНИЯ.

Эти испытания следует проводить полностью или частично только в тех случаях, когда этого требует заявленный состав или область применения материала.

Фенольные антиоксиданты. Определение проводят методом жидкостной хроматографии (*2.2.29*).

Условия хроматографирования:

- колонка из нержавеющей стали размером 0,25 м × 4,6 мм, заполненная сорбентом *силикагель октадецилсилильный для хроматографии Р* с размером частиц 5 мкм,
- подвижная фаза: одна из 4 следующих смесей:

Подвижная фаза 1 со скоростью 2 мл/мин: 10 объемов *воды Р*, 70 объемов *ацетонитрила Р,*

Подвижная фаза 2 со скоростью 1,5 мл/мин: 10 объемов *воды Р*, 30 объемов *тетрагидрофурана Р*, 60 объемов *ацетонитрила Р,*

Подвижная фаза 3 со скоростью 1,5 мл/мин: 5 объемов *воды Р*, 45 объемов *2-пропанола Р*, 50 объемов *метанола Р,*

Подвижная фаза 4 со скоростью 1,5 мл/мин: 20 объемов *тетрагидрофурана Р*, 80 объемов *ацетонитрила Р,*

- детектирование при длине волны 280 нм для подвижной фазы 1-3, при длине волны 270 нм – для подвижной фазы 4.

Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

- коэффициент разделения пиков добавок к пластмассе 07 и 08 при использовании подвижной фазы 1 должен быть не менее 8,0,
- коэффициент разделения пиков добавок к пластмассе 09 и 10 при использовании подвижной фазы 2 должен быть не менее 2,0,
- коэффициент разделения пиков добавок к пластмассе 11 и 12 при использовании подвижной фазы 3 должен быть не менее 2,0,
- коэффициент разделения двух основных пиков добавки к пластмассе 18 при использовании подвижной фазы 3 (время удерживания около 3,5 и 5,8) должен быть не менее 6,0.

Испытуемый раствор S21. 50 мл раствора S2 выпаривают досуха в вакууме при температуре 45^{0}C. Остаток растворяют в 5,0 мл смеси равных объемов *ацетонитрила Р* и *тетрагидрофурана Р*. Контрольный раствор готовят из контрольного раствора, соответствующего раствору S2.

Испытуемый раствор S22. 50 мл раствора S2 выпаривают досуха в вакууме при температуре 45^{0}C. Остаток растворяют в 5,0 мл *метиленхлорида Р*. Контрольный раствор готовят из контрольного раствора, соответствующего раствору S2.

Испытуемый раствор S23. 50 мл раствора S2 выпаривают досуха в вакууме при температуре 45^{0}С. Остаток растворяют в 5,0 мл смеси равных объемов *ацетонитрила Р* и раствора 10 г/л *трет-бутилгидропероксида Р* в *тетрагидрофуране Р*. Закрывают колбу и оставляют на 1 ч. Контрольный раствор готовят из контрольного раствора, соответствующего раствору S2.

Из приведенных ниже растворов сравнения готовят только те, которые необходимы для анализа фенольных антиоксидантов, входящих в состав испытуемого материала.

Раствор сравнения (a). 25,0 мг *бутилгидрокситолуола ФСО* (добавка к пластмассе 07) и 60,0 мг *добавки к пластмассе 08 ФСО* растворяют в 10 мл смеси равных объемов *ацетонитрила Р* и *тетрагидрофурана Р*. 2,0 мл полученного раствора доводят суммой равных объемов *ацетонитрила Р* и *тетрагидрофурана Р* до объема 50,0 мл.

Раствор сравнения (в). 60,0 мг *добавки к пластмассе 09 ФСО* и 60,0 мг *добавки к пластмассе 10 ФСО* растворяют в 10 мл смеси равных объемов *ацетонитрила Р* и *тетрагидрофурана Р*. 2,0 мл полученного раствора доводят суммой равных объемов *ацетонитрила Р* и *тетрагидрофурана Р* до объема 50,0 мл.

Раствор сравнения (c). 60,0 мг *добавки к пластмассе 11 ФСО* и 60,0 мг *добавки к пластмассе 12 ФСО* растворяют в 10 мл *метиленхлорида Р*. 2,0 мл полученного раствора доводят *метиленхлоридом Р* до объема 50,0 мл.

Раствор сравнения (d). 25,0 мг *добавки к пластмассе 07 ФСО* растворяют в 10 мл смеси равных объемов *ацетонитрила Р* и *тетрагидрофурана Р*. 2,0 мл полученного раствора доводят суммой равных объемов *ацетонитрила Р* и *тетрагидрофурана Р* до объема 50,0 мл.

Раствор сравнения (e). 60,0 мг *добавки к пластмассе 08 ФСО* растворяют в 10 мл смеси равных объемов *ацетонитрила Р* и *тетрагидрофурана Р*. 2,0 мл полученного раствора доводят суммой равных объемов *ацетонитрила Р* и *тетрагидрофурана Р* до объема 50,0 мл.

Раствор сравнения (f). 60,0 мг *добавки к пластмассе 13 ФСО* растворяют в 10 мл смеси равных объемов *ацетонитрила Р* и *тетрагидрофурана Р*. 2,0 мл полученного раствора доводят суммой равных объемов *ацетонитрила Р* и *тетрагидрофурана Р* до объема 50,0 мл.

Раствор сравнения (g). 60,0 мг *добавки к пластмассе 09 ФСО* растворяют в 10 мл смеси равных объемов *ацетонитрила Р* и *тетрагидрофурана Р*. 2,0 мл полученного раствора доводят суммой равных объемов *ацетонитрила Р* и *тетрагидрофурана Р* до объема 50,0 мл.

Раствор сравнения (h). 60,0 мг *добавки к пластмассе 10 ФСО* растворяют в 10 мл смеси равных объемов *ацетонитрила Р* и *тетрагидрофурана Р*. 2,0 мл полученного раствора доводят суммой равных объемов *ацетонитрила Р* и *тетрагидрофурана Р* до объема 50,0 мл.

Раствор сравнения (i). 60,0 мг *добавки к пластмассе 11 ФСО* растворяют в 10 мл *метиленхлорида Р*. 2,0 мл полученного раствора доводят *метиленхлоридом Р* до объема 50,0 мл.

Раствор сравнения (j). 60,0 мг *добавки к пластмассе 12 ФСО* растворяют в 10 мл *метиленхлорида Р*. 2,0 мл полученного раствора доводят *метиленхлоридом Р* до объема 50,0 мл.

Раствор сравнения (k). 20,0 мг *добавки к пластмассе 18 ФСО* растворяют в 10 мл смеси равных объемов *ацетонитрила Р* и раствора 10 г/л *трет-бутилгидропероксида Р* в *тетрагидрофуране Р*. Закрывают колбу и оставляют на 1 ч. 2,0 мл полученного раствора доводят суммой равных объемов *ацетонитрила Р* и *тетрагидрофурана Р* до объема 50,0 мл.

Если испытуемый материал содержит добавку к пластмассе 07 и/или добавку к пластмассе 08, используют подвижную фазу 1. Хроматографируют по 20 мкл испытуемого раствора S21, соответствующего раствора сравнения, растворов сравнения (a), (d) или (e) или растворов сравнения (d) или (e).

Если испытуемый материал содержит один или более из следующих антиоксидантов:

- добавка к пластмассе 09,
- добавка к пластмассе 10,
- добавка к пластмассе 11,
- добавка к пластмассе 12,
- добавка к пластмассе 13,

используют подвижную фазу 2. Хроматографируют по 20 мкл испытуемого раствора S21, соответствующего контрольного раствора, раствора сравнения (b) и растворов сравнения антиоксидантов из вышеперечисленного перечня, которые входят в состав испытуемого материала.

Если испытуемый материал содержит добавку к пластмассе 11 и/или добавку к пластмассе 12, используют подвижную фазу 3. Хроматографируют по 20 мкл испытуемого раствора S22, соответствующего контрольного раствора, растворов сравнения (c), (i) или (j) или растворов сравнения (i) или (j).

Если испытуемый материал содержит добавку к пластмассе 18, используют подвижную фазу 4. Хроматографируют по 20 мкл испытуемого раствора S23, соответствующего контрольного раствора и раствора сравнения (k).

Во всех случаях время хроматографирования должно составлять 30 мин. На хроматограммах испытуемых растворов S21, S22 и S23 могут появляться пики антиоксидантов, которые входят в состав испытуемого материала, и дополнительные пики, которые также могут появляться на хроматограммах соответствующих контрольных растворов. На хроматограммах испытуемых растворов S21, S22 и S23 площади пиков не должны превышать площади пиков на хроматограммах растворов сравнения (d) – (k).

Нефенольные антиоксиданты. Определение проводят методом тонкослойной хроматографии (*2.2.27*), используя *ТСХ пластину со слоем силикагеля* GF_{254} *Р*.

Испытуемый раствор S24. 100 мл раствора *S2* выпаривают досуха в вакууме при температуре 45^{0}С. Остаток растворяют в 2 мл *метиленхлорида подкисленного Р*.

Раствор сравнения (l). 60 мг *добавки к пластмассе 14 ФСО* растворяют в 10 мл *метиленхлорида Р*. 2,0 мл полученного раствора доводят *метиленхлоридом Р* до объема 10,0 мл.

Раствор сравнения (m). 60 мг *добавки к пластмассе 15 ФСО* растворяют в 10 мл *метиленхлорида Р*. 2,0 мл полученного раствора доводят *метиленхлоридом подкисленным Р* до объема 10,0 мл.

Раствор сравнения (n). 60 мг *добавки к пластмассе 16 ФСО* растворяют в 10 мл *метиленхлорида Р*. 2,0 мл полученного раствора доводят *метиленхлоридом подкисленным Р* до объема 10,0 мл.

Раствор сравнения (o). 60 мг *добавки к пластмассе 17 ФСО* растворяют в 10 мл *метиленхлорида Р*. 2,0 мл полученного раствора доводят *метиленхлоридом подкисленным Р* до объема 10,0 мл.

Раствор сравнения (p). 60 мг *добавки к пластмассе 16 ФСО* и *добавки к пластмассе 17 ФСО* растворяют в 10 мл *метиленхлорида Р*. 2,0 мл полученного раствора доводят *метиленхлоридом подкисленным Р* до объема 10,0 мл.

На линию старта хроматографической пластины наносят по 20 мкл испытуемого раствора S24, раствора сравнения (p) и растворов сравнения, которые соответствуют всем фенольным и нефенольным антиоксидантам, входящим в состав типового образца испытуемого материала. Помещают пластину в хроматографическую камеру, содержащую в качестве подвижной фазы *гексан Р*. Когда расстояние, пройденное подвижной фазой от линии старта, составит 18 см, пластину вынимают из камеры, сушат на воздухе и снова помещают в камеру с *метиленхлоридом Р*. Когда расстояние, пройденное подвижной фазой от линии старта, составит 17 см, пластину вынимают из камеры, сушат на воздухе и анализируют в УФ – свете при длине волны 254 нм. Опрыскивают *раствором йода спиртовым Р* и через 10 -15 минут анализируют в УФ – свете при длине волны 254 нм. На хроматограмме испытуемого раствора S24 какие-либо пятна должны быть не более интенсивными, чем пятна на хроматограммах растворов сравнения. Результаты анализа считаются достоверными, если на хроматограмме раствора сравнения (p) проявляются два четко разделенных пятна.

Добавка к пластмассе 22. Определение проводят методом жидкостной хроматографии (*2.2.29*).

Испытуемый раствор. 25 мл раствора S2 выпаривают досуха в вакууме при температуре 45^{0}С. Остаток растворяют в 10 мл *толуола Р* и 10 мл раствора 10 г/л *тетрабутиламмония гидроксида Р* в смеси 35 объемов *толуола Р* и 65 объемов *этанола Р*. Кипятят с обратным холодильником в течение 3 ч. Охлаждают и, если необходимо, фильтруют.

Раствор сравнения. 30 мг *добавки к пластмассе 22 ФСО* растворяют в 50 мл *толуола Р*. 1 мл полученного раствора прибавляют к 25 мл раствора сравнения S2 и выпаривают досуха в вакууме при температуре 45^{0}С. Остаток растворяют в

10 мл *толуола Р* и 10 мл раствора 10 г/л *тетрабутиламмония гидроксида Р* в смеси 35 объемов *толуола Р* и 65 объемов *этанола Р*. Кипятят с обратным холодильником в течение 3 ч. Охлаждают и, если необходимо, фильтруют.

Условия хроматографирования:
- колонка из нержавеющей стали размером 0,25 м × 4,6 мм, заполненная сорбентом *силикагель аминопропилсилильный для хроматографии Р* с размером частиц 5 мкм,
- подвижная фаза: 11 объемов *этанола Р* и 89 объемов *гексана Р,*
- скорость подвижной фазы 2 мл/мин,
- детектирование при длине волны 227 нм.

Хроматографируют по 20 мкл каждого раствора. Время хроматографирования должно быть 10 мин. При хроматографировании в указанных условиях коэффициент разделения пиков, соответствующих «диолу» и разведенному раствору сравнения, должен быть не менее 7. На хроматограмме испытуемого раствора площадь пика, соответствующего «диольному» компоненту в добавке к пластмассе 22, не должна превышать площади соответствующего пика на хроматограмме раствора сравнения.

Амиды и стеараты. Определение проводят методом тонкослойной хроматографии (2.2.27), используя две *ТСХ пластины со слоем силикагеля* GF_{254} *Р*.

Испытуемый раствор. Используют испытуемый раствор S24, приготовленный, как описано в испытании «Нефенольные антиоксиданты».

Раствор сравнения (q). 20 мг *кислоты стеариновой ФСО* (добавки к пластмассе 19) растворяют в *метиленхлориде Р* и доводят объем раствора тем же растворителем до 10 мл.

Раствор сравнения (r). 40 мг *олеамида ФСО* (добавки к пластмассе 20) растворяют в *метиленхлориде Р* и доводят объем раствора тем же растворителем до 20 мл.

Раствор сравнения (s). 40 мг *эрукамида ФСО* (добавки к пластмассе 21) растворяют в *метиленхлориде Р* и доводят объем раствора тем же растворителем до 20 мл.

На линию старта двух хроматографических пластин наносят по 10 мкл испытуемого раствора S24. На первую хроматографическую пластину наносят 10 мкл раствора сравнения *(q);* на другую пластину – по 10 мкл растворов сравнения *(r)* и *(s).*

Первую пластину помещают в камеру со смесью растворителей 25 объемов *этанола Р* и 75 объемов *триметилпентана Р*. Когда фронт растворителей пройдет 10 см от линии старта, пластину вынимают из камеры и сушат на воздухе. Опрыскивают раствором 2 г/л *дихлорфенолиндофенола натриевой соли Р* в *этаноле Р* и нагревают в сушильном шкафу при температуре 120^{0}С в течение нескольких минут до усиления интенсивности пятен. На хроматограмме испытуемого раствора S24 пятно, соответствующее добавке к пластмассе 19, должно быть идентично ему по расположению (R_f около 0,5) и не более интенсивным, чем пятно на хроматограмме раствора сравнения *(q).*

Другую пластину помещают в камеру с *гексаном Р*. Когда фронт растворителя пройдет 13 см от линии старта, пластину вынимают из камеры, сушат на воздухе и снова помещают в камеру со смесью растворителей 5 объемов *метанола Р* и 95 объемов *метиленхлорида Р*. Когда фронт растворителей пройдет 10 см от линии старта, пластину вынимают из камеры и сушат на воздухе. Опрыскивают раствором 40 г/л *кислоты фосфорномолибденовой Р* в *этаноле Р* и нагревают в сушильном шкафу при температуре 120^{0}С до появления пятен. На хроматограмме испытуемого раствора S24 пятно, соответствующее добавкам к пластмассе 20 или 21, должно быть идентично ему по расположению (R_f около 0,2) и не более интенсивным, чем пятна на хроматограммах растворов сравнения *(r)* и *(s).*

3.1.4. ПОЛИЭТИЛЕН БЕЗ ДОБАВОК ДЛЯ КОНТЕЙНЕРОВ ДЛЯ ПАРЕНТЕРАЛЬНЫХ И ОФТАЛЬМОЛОГИЧЕСКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Полиэтилен без добавок получают полимеризацией этилена под высоким давлением в присутствии кислорода или инициаторов образования свободных радикалов как катализаторов.

ОПИСАНИЕ

Шарики, гранулы, порошок или, после трансформации, прозрачные пластинки различной толщины. Практически нерастворим в воде, этаноле, гексане и метаноле, растворим в горячих ароматических углеводородах. Размягчается при температуре выше 65^{0}С.

Относительная плотность *(2.2.5*) составляет от 0,910 до 0,937.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ

Если необходимо, образцы испытуемого материала разрезают на части с максимальной длиной стороны не более 1 см.

А. К 0,25 г испытуемого материала прибавляют 10 мл *толуола Р* и нагревают с обратным холодильником в течение 15 мин. Несколько капель раствора помещают на диск натрия хлорида и выпаривают растворитель в сушильном шкафу при температуре 80^{0}С. Инфракрасный спектр *(2.2.24)* испытуемого материала должен иметь максимумы, в частности, при следующих волновых числах: 2920 см$^{-1}$, 2850 см$^{-1}$, 1465 см$^{-1}$, 730 см$^{-1}$,720 см$^{-1}$; полученный спектр должен быть идентичен спектру типового образца.

Б. Испытуемый материал соответствует требованиям на предельное содержание добавок (см. Испытания).

ИСПЫТАНИЯ

Если необходимо, перед определением образцы испытуемого материала разрезают на части с максимальной длиной стороны не более 1 см.

Раствор S1. 25 г испытуемого материала помещают в колбу из боросиликатного стекла с притертой пробкой. Прибавляют 500 мл *воды для инъекций Р* и нагревают с обратным холодильником в течение 5 ч. Охлаждают и фильтруют. Часть раствора оставляют для проведения испытаний на внешний вид раствора. Оставшуюся часть раствора фильтруют через стеклянный фильтр (16). *Раствор S1 используют в течение 4 ч после приготовления.*

Раствор S2. 2,0 г испытуемого материала помещают в коническую колбу из боросиликатного стекла с притертой пробкой. Прибавляют 80 мл *толуола Р* и кипятят с обратным холодильником при постоянном перемешивании в течение 1,5 ч. Охлаждают до 60^0С и добавляют при продолжительном перемешивании 120 мл *метанола Р*. Фильтруют раствор через стеклянный фильтр (16). Промывают колбу и фильтр 25 мл смеси *толуол Р – метанол Р* (40:60), прибавляют промывную жидкость к фильтрату и доводят объем раствора той же смесью до 250 мл. Параллельно готовят контрольный раствор.

Раствор S3.100 г испытуемого материала помещают в коническую колбу из боросиликатного стекла с притертой пробкой. Прибавляют 250 мл *0,1 М раствора кислоты хлористоводородной* и кипятят с обратным холодильником при постоянном помешивании в течение 1 ч. Охлаждают и фильтруют раствор.

Внешний вид раствора. Раствор S1 должен быть прозрачным *(2.2.1)* и бесцветным *(2.2.2, Метод II)*.

Кислотность или щелочность. К 100 мл раствора S1 прибавляют 0,15 мл *раствора BRP индикатора Р*. Для изменения окраски раствора на синюю должно потребоваться не более 1,5 мл *0,01 М раствора натрия гидроксида*. К 100 мл раствора S1 прибавляют 0,2 мл *раствора метилового оранжевого Р*. Для изменения желтой окраски раствора на оранжевую должно потребоваться не более 1,0 мл *0,01 М раствора кислоты хлористоводородной*.

Оптическая плотность *(2.2.25)*. Оптическая плотность раствора S1 в диапазоне длин волн от 220 нм до 340 нм не должна превышать 0,2.

Восстановители. К 20 мл раствора S1 прибавляют 1 мл *кислоты серной разведенной Р* и 20 мл *0,002 М раствора калия перманганата*. Кипятят с обратным холодильником в течение 3 мин и немедленно охлаждают. Добавляют 1 г *калия йодида Р* и немедленно титруют раствор *0,01 М раствором натрия тиосульфата*, используя в качестве индикатора 0,25 мл *раствора крахмала Р*. Параллельно проводят контрольный опыт. Разность между объемами титранта не должна превышать 0,5 мл.

Вещества, растворимые в гексане. 10 г испытуемого материала помещают в коническую колбу из боросиликатного стекла с притертой пробкой вместимостью 250 мл. Прибавляют 100 мл *гексана Р* и кипятят с обратным холодильником при постоянном перемешивании в течение 4 ч. Охлаждают на ледяной бане и быстро фильтруют через стеклянный фильтр (16), поддерживая температуру раствора на уровне 0^0С (время фильтрования должно составлять менее 5 мин; при необходимости для ускорения процесса допускается фильтрование под давлением). 20 мл фильтрата выпаривают в предварительно взвешенной стеклянной чашке на водяной бане. Остаток высушивают в сушильном шкафу при температуре $(100\text{-}105)^0$С

в течение 1 ч. Масса полученного остатка должна находиться в пределах 10 % от массы остатка, полученного для типового образца и не должна превышать 5 %.

Добавки. Определение проводят методом тонкослойной хроматографии *(2.2.27)*, используя в качестве неподвижной фазы *ТСХ пластину со слоем силикагеля G Р*.

Испытуемый раствор. 50 мл раствора S2 выпаривают досуха в вакууме при температуре 45^{0}С. Полученный остаток растворяют в 5 мл *метиленхлорида Р*. Контрольный раствор готовят из контрольного раствора, соответствующего раствору S2.

Раствор сравнения. 20 мг *добавки к пластмассе 15 ФСО* и 20 мг *добавки к пластмассе 08 ФСО* растворяют в *метиленхлориде Р* и доводят объем раствора растворителем до 10 мл.

На линию старта хроматографической пластины наносят по 10 мкл каждого раствора. Помещают пластину в хроматографическую камеру, содержащую в качестве подвижной фазы *гексан Р*. Когда расстояние, пройденное подвижной фазой от линии старта, составит 13 см, пластину вынимают. Высушивают на воздухе. Снова помещают пластину в хроматографическую камеру, содержащую смесь растворителей *метанол Р – метиленхлорид Р* (5:95). Когда расстояние, пройденное подвижной фазой от линии старта, составит 10 см, пластину вынимают из камеры. Высушивают на воздухе, опрыскивают раствором 40 г/л *кислоты фосфорномолибденовой Р* в *спирте Р* и нагревают при температуре 120^{0}С до появления пятна на хроматограмме раствора. На хроматограмме испытуемого раствора не должно быть пятен, за исключением пятна на фронте растворителей после первого их прохождения и соответствующего олигомерам. Пренебрегают любыми пятнами на хроматограмме испытуемого раствора, соответствующими аналогичным пятнам на хроматограмме раствора сравнения. На хроматограмме раствора сравнения должны быть видны два четко разделенных пятна.

Экстрагируемые тяжелые металлы *(2.4.8)*. 50 мл раствора S3 упаривают до объема около 5 мл на водяной бане и доводят объем раствора *водой Р* до 20 мл. 12 мл полученного раствора соответствует испытанию А на предельное содержание тяжелых металлов (2,5 ppm). Эталонный раствор готовят, используя 2,5 мл *эталонного раствора свинца (10 ppm Pb) Р*.

Сульфатная зола *(2.4.14)*. Не более 0,02 % при определении из 5,0 г испытуемого материала.

3.1.5. ПОЛИЭТИЛЕН С ДОБАВКАМИ ДЛЯ КОНТЕЙНЕРОВ ДЛЯ ПАРЕНТЕРАЛЬНЫХ И ОФТАЛЬМОЛОГИЧЕСКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Полиэтилен с добавками, полученный полимеризацией этилена под высоким давлением в присутствии катализатора или сополимеризацией этилена с не более 25 % гомологов высших алкенов (от C_3 до C_{10}).

ПРОИЗВОДСТВО

Определенное количество добавок вводится в полимер для улучшения его химических, физических и механических свойств, а также для обеспечения возможности использования по назначению. Все добавки выбирают из нижеследующего перечня, который определяет для каждого вещества максимально допустимое его содержание.

Они могут содержать не более трех антиоксидантов, один или несколько смазывающих или антиадгезивных веществ, а также титана диоксид, как средство придающее непрозрачность для защиты материала от света.

- бутилгидрокситолуол (добавка к пластмассе 07) (не более 0,125 %),
- пентаэритритил тетракис [3-(3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидрокси-фенил)пропионат] (добавка к пластмассе 09) (не более 0,3 %),
- 1,3,5-трис(3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидроксибензил)-s- триазин-2,4,6(1*H*,3*H*,5*H*)-трион (добавка к пластмассе 13) (не более 0,3 %),
- октадецил 3-(3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидроксифенил)пропионат (добавка к пластмассе 11) (не более 0,3 %),
- этилен бис[3,3-бис[3-(1,1-диметилэтил)-4-гидроксифенил]бутаноат] (добавка к пластмассе 08) (не более 0,3 %),
- диоктадецил дисульфид (добавка к пластмассе15) (не более 0,3 %),
- 4,4',4''-(2,4,6-триметилбензол-1,3,5-триилтрисметилен)трис[2,6-бис(1,1 - диметилэтил)фенол] (добавка к пластмассе 10) (не более 0,3 %),
- 2,2' – бис(октадецилокси)-5,5'-спироби[1,3,2-диоксафосфинан] (добавка к пластмассе 14) (не более 0,3 %),
- дидодецил 3,3'-тиодипропионат (добавка к пластмассе 16) (не более 0,3 %),
- диоктадецил 3,3'-тиодипропионат (добавка к пластмассе 17) (не более 0,3 %),
- трис[2,4-бис(1,1-диметилэтил)фенил]фосфит (добавка к пластмассе 12) (не более 0,3 %).

Общая сумма антиоксидантных добавок не должна превышать 0,3 %.

- гидротальцит (не более 0,5 %),
- алканамиды (не более 0,5%),
- алкенамиды (не более 0,5 %),
- натрия алюмосиликат (не более 0,5 %),
- кремния диоксид (не более 0,5 %),
- натрия бензоат (не более 0,5 %),
- эфиры и соли жирных кислот (не более 0,5 %),
- натрия фосфат (не более 0,5 %),
- вазелиновое масло (не более 0,5 %),
- тальк (не более 0,5 %),
- цинка оксид (не более 0,5 %),
- магния оксид (не более 0,2 %),
- кальция стеарат или цинка стеарат или их смесь (не более 0,5 %),
- титана диоксид (не более 4 %) только для материалов для производства контейнеров, применяемых в офтальмологии.

Поставщик материала несет ответственность за то, чтобы качественный и количественный состав типового образца соответствовал качественному и количественному составу каждой произведенной серии.

ОПИСАНИЕ

Порошок, шарики, гранулы или, после трансформации, прозрачные пластинки различной толщины или контейнеры. Практически нерастворим в воде, этаноле, гексане и метаноле, растворим в горячих ароматических углеводородах. Размягчается при температуре (70-140)^{0}C.

Относительная плотность *(2.2.5)* составляет от 0,890 до 0,965.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ

Если необходимо, образцы испытуемого материала разрезают на части с максимальной длиной стороны не более 1 см.

А. К 0,25 г испытуемого материала прибавляют 10 мл *толуола Р* и кипятят с обратным холодильником в течение 15 мин. Несколько капель раствора помещают на диск натрия хлорида и выпаривают растворитель в сушильном шкафу при температуре 80^{0}C. Инфракрасный спектр *(2.2.24)* испытуемого материала должен иметь максимумы, в частности, при следующих волновых числах: 2920 см$^{-1}$, 2850 см$^{-1}$, 1465 см$^{-1}$, 1375 см$^{-1}$, 1170 см$^{-1}$, 730 см$^{-1}$,720 см$^{-1}$; полученный спектр должен быть идентичен спектру типового образца. Если испытуемый материал имеет форму пластин, то идентификация проводится на вырезанном, определенного размера фрагменте пластинки.

Б. Испытуемый материал соответствует требованиям на предельное содержание добавок (см. Испытания).

С. Около 25 мг испытуемого материала смешивают в платиновом тигле с 1 г *калия гидросульфата Р* и нагревают до полного расплавления. Охлаждают и прибавляют 20 мл *кислоты серной разведенной Р*. Осторожно нагревают и фильтруют полученный раствор. К фильтрату прибавляют 1 мл *водорода пероксида раствора концентрированного Р*. Если испытуемый материал содержит титана диоксид, появляется оранжево-желтое окрашивание.

ИСПЫТАНИЯ

Если необходимо, образцы испытуемого материала разрезают на части с максимальной длиной стороны не более 1 см.

Раствор S1. 25 г испытуемого материала помещают в колбу из боросиликатного стекла с притертой пробкой. Прибавляют 500 мл *воды для инъекций Р* и нагревают с обратным холодильником в течение 5 ч. Охлаждают и декантируют. Часть раствора оставляют для проведения испытаний внешнего вида раствора. Оставшуюся часть раствора фильтруют через стеклянный фильтр (16). *Раствор S1 используют в течение 4 ч после приготовления.*

Раствор S2. 2,0 г испытуемого материала помещают в коническую колбу из боросиликатного стекла с притертой пробкой. Прибавляют 80 мл *толуола Р* и кипятят с обратным холодильником при постоянном перемешивании в течение 1,5 ч. Охлаждают до 60^{0}C и добавляют при постоянном перемешивании 120 мл *метанола Р*. Фильтруют раствор через стеклянный фильтр (16). Промывают колбу и

фильтр 25 мл смеси *толуол Р – метанол Р* (40:60), присоединяют промывную жидкость к фильтрату и доводят объем раствора той же смесью до 250 мл. Параллельно готовят контрольный раствор.

Раствор S3.100 г испытуемого материала помещают в коническую колбу из боросиликатного стекла с притертой пробкой. Прибавляют 250 мл *0,1 М раствора кислоты хлористоводородной* и кипятят с обратным холодильником при постоянном перемешивании в течение 1 ч. Охлаждают и декантируют раствор.

Внешний вид раствора. Раствор S1 должен быть прозрачным *(2.2.1)* и бесцветным *(2.2.2, Метод II)*.

Кислотность или щелочность. К 100 мл раствора S1 прибавляют 0,15 мл *раствора BRP индикатора Р*. Для изменения окраски раствора на синюю должно потребоваться не более 1,5 мл *0,01 М раствора натрия гидроксида*. К 100 мл раствора S1 прибавляют 0,2 мл *раствора метилового оранжевого Р*. Для изменения желтой окраски раствора на оранжевую должно потребоваться не более 1,0 мл *0,01 М раствора кислоты хлористоводородной*.

Оптическая плотность *(2.2.25)*. Оптическая плотность раствора S1 в диапазоне длин волн от 220 нм до 340 нм не должна превышать 0,2.

Восстановители. К 20 мл раствора S1 прибавляют 1 мл *кислоты серной разведенной Р* и 20 мл *0,002 М раствора калия перманганата*. Кипятят с обратным холодильником в течение 3 мин и сразу охлаждают. Добавляют 1 г *калия йодида Р* и немедленно титруют раствор *0,01 М раствором натрия тиосульфата*, используя в качестве индикатора 0,25 мл *раствора крахмала Р*. Параллельно проводят контрольный опыт. Разность между объемами титранта не должна превышать 0,5 мл.

Вещества, растворимые в гексане. 10 г испытуемого материала помещают в коническую колбу из боросиликатного стекла с притертой пробкой вместимостью 250 мл. Прибавляют 100 мл *гексана Р* и кипятят с обратным холодильником при постоянном помешивании в течение 4 ч. Охлаждают на ледяной бане и быстро фильтруют через стеклянный фильтр (16), поддерживая температуру раствора на уровне 0^0С (время фильтрования должно составлять менее 5 мин; при необходимости для ускорения процесса допускается фильтрование под давлением). 20 мл фильтрата выпаривают в предварительно взвешенной чашке из боросиликатного стекла на водяной бане. Остаток высушивают в сушильном шкафу при температуре $(100\text{-}105)^0$С в течение 1 ч. Масса полученного остатка должна находиться в пределах 10 % от массы остатка, полученного для типового образца и не должна превышать 5 %.

Экстрагируемый алюминий. Не более 1 ppm экстрагируемого Al. Определение проводят методом атомно-эмиссионной спектрометрии в среде аргона *(2.2.22, Метод I)*.

Испытуемый раствор. Используют раствор S3.

Растворы сравнения. Растворы сравнения готовят разбавлением *эталонного раствора алюминия (200 ppm Al) Р 0,1 М раствором кислоты хлористоводородной*.

Определение проводят, измеряя интенсивность светоиспускания алюминия при длине волны 396,15 нм, регулируя спектральный фон на уровне 396,25 нм.

Проверяют отсутствие алюминия в используемой кислоте хлористоводородной.

Экстрагируемый хром. Не более 0,05 ppm экстрагируемого Cr. Определение проводят методом атомно-эмиссионной спектрометрии в среде аргона *(2.2.22, Метод I)*.

Испытуемый раствор. Используют раствор S3.

Растворы сравнения. Растворы сравнения готовят разбавлением *эталонного раствора хрома (100 ppm Cr) Р* смесью *кислоты хлористоводородной Р* и *воды Р* (2:8).

Определение проводят, измеряя интенсивность светоиспускания хрома при длине волны 205,55 нм, регулируя спектральный фон на уровне 205,50 нм.

Проверяют отсутствие хрома в используемой кислоте хлористоводородной.

Экстрагируемый титан. Не более 1 ppm экстрагируемого Ti. Определение проводят методом атомно-эмиссионной спектрометрии в среде аргона *(2.2.22, Метод I)*.

Испытуемый раствор. Используют раствор S3.

Растворы сравнения. Растворы сравнения готовят разбавлением *эталонного раствора титана (100 ppm Ti) Р 0,1 М раствором кислоты хлористоводородной*.

Определение проводят, измеряя интенсивность светоиспускания титана при длине волны 336,12 нм, регулируя спектральный фон на уровне 336,16 нм.

Проверяют отсутствие титана в используемой кислоте хлористоводородной.

Экстрагируемый ванадий. Не более 0,1 ppm экстрагируемого V. Определение проводят методом атомно-эмиссионной спектрометрии в среде аргона *(2.2.22, Метод I)*.

Испытуемый раствор. Используют раствор S3.

Растворы сравнения. Растворы сравнения готовят разбавлением *эталонного раствора ванадия (1 г/л V) Р* смесью *кислоты хлористоводородной Р* и *воды Р* (2:8).

Определение проводят, измеряя интенсивность светоиспускания ванадия при длине волны 292,40 нм, регулируя спектральный фон на уровне 292,35 нм.

Проверяют отсутствие ванадия в используемой кислоте хлористоводородной.

Экстрагируемый цинк. Не более 1 ppm экстрагируемого Zn. Определение проводят методом атомно-абсорбционной спектрометрии *(2.2.23, Метод I)*.

Испытуемый раствор. Используют раствор S3.

Растворы сравнения. Растворы сравнения готовят разбавлением *эталонного раствора цинка (10 ppm Zn) Р 0,1 М раствором кислоты хлористоводородной*.

Измеряют оптическую плотность при длине волны 213,9 нм, используя в качестве источника излучения лампу с полым цинковым катодом и воздушно-ацетиленовое пламя.

Проверяют отсутствие цинка в используемой кислоте хлористоводородной.

Экстрагируемый цирконий. Не более 0,1 ppm экстрагируемого Zr. Определение проводят методом атомно-эмиссионной спектрометрии в среде аргона *(2.2.22, Метод I)*.

Испытуемый раствор. Используют раствор S3.

Растворы сравнения. Растворы сравнения готовят разбавлением *эталонного раствора циркония (1 г/л Zr) Р* смесью *кислоты хлористоводородной Р* и *воды Р* (2:8).

Определение проводят, измеряя интенсивность светоиспускания циркония при длине волны 343,82 нм, регулируя спектральный фон на уровне 343,92 нм.

Проверяют отсутствие циркония в используемой кислоте хлористоводородной.

Экстрагируемые тяжелые металлы *(2.4.8)*. 50 мл раствора S3 упаривают до объема около 5 мл на водяной бане и доводят объем раствора *водой Р* до 20 мл. 12 мл полученного раствора соответствует испытанию А на предельное содержание тяжелых металлов (2,5 ppm). Эталонный раствор готовят, используя 2,5 мл *эталонного раствора свинца (10 ppm Pb) Р*.

Сульфатная зола *(2.4.14)*. Не более 1,0 % при определении из 5,0 г испытуемого материала. Данный предел не распространяется на материалы, содержащие титана диоксид.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ ИСПЫТАНИЯ

Данные испытания частично или полностью проводятся в тех случаях, если этого требует состав испытуемого материала.

Фенольные антиоксиданты. Определение проводят методом жидкостной хроматографии *(2.2.29)*.

Условия хроматографирования:

- колонка из нержавеющей стали длиной 0,25 м, с внутренним диаметром 4,6 мм, заполненная сорбентом *силикагель октадецилсилильный для хроматографии Р* с размером частиц 5 мкм;

- подвижная фаза – одна из трех следующих смесей:

подвижная фаза 1 со скоростью 2 мл/мин: 30 объемов *воды Р*, 70 объемов *ацетонитрила Р*,

подвижная фаза 2 со скоростью 1,5 мл/мин: 10 объемов *воды Р*, 30 объемов *тетрагидрофурана Р*, 60 объемов *ацетонитрила Р*,

подвижная фаза 3 со скоростью 1,5 мл/мин: 5 объемов *воды Р*, 45 объемов *пропанола-2 Р*, 50 объемов *метанола Р*,

- детектор спектрофотометрический с длиной волны 280 нм.

Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

- коэффициент разделения пиков добавки к пластмассе 07 и добавки к пластмассе 08 при использовании подвижной фазы 1 должен быть не менее 8,0,
- коэффициент разделения пиков добавки к пластмассе 09 и добавки к пластмассе 10 при использовании подвижной фазы 2 должен быть не менее 2,0,
- коэффициент разделения пиков добавки к пластмассе 11 и добавки к пластмассе 12 при использовании подвижной фазы 3 должен быть не менее 2,0.

Испытуемый раствор S21. 50 мл раствора S2 выпаривают досуха под вакуумом при температуре 45^{0}С. Остаток растворяют в 5,0 мл смеси равных объемов *ацетонитрила Р* и *тетрагидрофурана Р*. Параллельно готовят контрольный раствор, используя контрольный раствор, соответствующий раствору S2.

Испытуемый раствор S22. 50 мл раствора S2 выпаривают досуха под вакуумом при температуре 45^{0}С. Остаток растворяют в 5,0 мл *метиленхлорида Р*. Параллельно готовят контрольный раствор, используя контрольный раствор, соответствующий раствору S2.

Из нижеследующих растворов сравнения готовят только те, которые необходимы для анализа фенольных антиоксидантов, входящих в состав испытуемого материала.

Раствор сравнения (а). 25,0 мг *бутилгидрокситолуола ФСО* (добавка к пластмассе 07) и 60,0 мг *добавки к пластмассе 08 ФСО* растворяют в 10,0 мл смеси равных объемов *ацетонитрила Р* и *тетрагидрофурана Р*. 2,0 мл полученного раствора доводят суммой равных объемов *ацетонитрила Р* и *тетрагидрофурана Р* до объема 50,0 мл.

Раствор сравнения (в). 60,0 мг *добавки к пластмассе 09 ФСО* и 60,0 мг *добавки к пластмассе 10 ФСО* растворяют в 10,0 мл смеси равных объемов *ацетонитрила Р* и *тетрагидрофурана Р*. 2,0 мл полученного раствора доводят суммой равных объемов *ацетонитрила Р* и *тетрагидрофурана Р* до объема 50,0 мл.

Раствор сравнения (с). 60,0 мг *добавки к пластмассе 11 ФСО* и 60,0 мг *добавки к пластмассе 12 ФСО* растворяют в 10,0 мл *метиленхлорида Р*. 2,0 мл полученного раствора доводят *метиленхлоридом Р* до объема 50,0 мл.

Раствор сравнения (d). 25,0 мг *добавки к пластмассе 07 ФСО* растворяют в 10,0 мл смеси равных объемов *ацетонитрила Р* и *тетрагидрофурана Р*. 2,0 мл

полученного раствора доводят суммой равных объемов *ацетонитрила Р* и *тетрагидрофурана Р* до объема 50,0 мл.

Раствор сравнения (е). 60,0 мг *добавки к пластмассе 08 ФСО* растворяют в 10,0 мл смеси равных объемов *ацетонитрила Р* и *тетрагидрофурана Р*. 2,0 мл полученного раствора доводят суммой равных объемов *ацетонитрила Р* и *тетрагидрофурана Р* до объема 50,0 мл.

Раствор сравнения (f). 60,0 мг *добавки к пластмассе 13 ФСО* растворяют в 10,0 мл смеси равных объемов *ацетонитрила Р* и *тетрагидрофурана Р*. 2,0 мл полученного раствора доводят суммой равных объемов *ацетонитрила Р* и *тетрагидрофурана Р* до объема 50,0 мл.

Раствор сравнения (g). 60,0 мг *добавки к пластмассе 09 ФСО* растворяют в 10,0 мл смеси равных объемов *ацетонитрила Р* и *тетрагидрофурана Р*. 2,0 мл полученного раствора доводят суммой равных объемов *ацетонитрила Р* и *тетрагидрофурана Р* до объема 50,0 мл.

Раствор сравнения (h). 60,0 мг *добавки к пластмассе 10 ФСО* растворяют в 10,0 мл смеси равных объемов *ацетонитрила Р* и *тетрагидрофурана Р*. 2,0 мл полученного раствора доводят суммой равных объемов *ацетонитрила Р* и *тетрагидрофурана Р* до объема 50,0 мл.

Раствор сравнения (i). 60,0 мг *добавки к пластмассе 11 ФСО* растворяют в 10,0 мл *метиленхлорида Р*. 2,0 мл полученного раствора доводят *метиленхлоридом Р* до объема 50,0 мл.

Раствор сравнения (j). 60,0 мг *добавки к пластмассе 12 ФСО* растворяют в 10,0 мл *метиленхлорида Р*. 2,0 мл полученного раствора доводят *метиленхлоридом Р* до объема 50,0 мл.

Если испытуемый материал содержит добавку к пластмассе 07 и/или добавку к пластмассе 08, используют подвижную фазу 1. Хроматографируют по 20 мкл испытуемого раствора S21, соответствующего контрольного раствора, растворов сравнения (а), (d) или (е) или растворов сравнения (d) и (е).

Если испытуемый материал содержит один или более из следующих антиоксидантов:

- добавка к пластмассе 09,
- добавка к пластмассе 10,
- добавка к пластмассе 11,
- добавка к пластмассе 12,
- добавка к пластмассе 13,

используют подвижную фазу 2. Хроматографируют по 20 мкл испытуемого раствора S21, соответствующего контрольного раствора, раствора сравнения (b) и растворов сравнения антиоксидантов из вышеперечисленного перечня, которые входят в состав испытуемого материала.

Если испытуемый материал содержит добавку к пластмассе 11 и/или добавку к пластмассе 12, используют подвижную фазу 3. Хроматографируют по 20 мкл испытуемого раствора S22, соответствующего контрольного раствора, растворов сравнения (с) и (i) или (j) или растворов сравнения (i) или (j).

Во всех случаях время хроматографирования должно составлять 30 мин. На хроматограммах испытуемых растворов S21 и S22 могут появляться только пики антиоксидантов, которые входят в состав испытуемого материала, и дополнительные пики, которые также могут появляться на хроматограммах соответствующих контрольных растворов. На хроматограммах испытуемых растворов S21 и S22 площади пиков не должны превышать площади пиков на хроматограммах растворов сравнения (d) – (j).

Нефенольные антиоксиданты. Определение проводят методом тонкослойной хроматографии *(2.2.27)*, используя *ТСХ пластину со слоем силикагеля* GF_{254} *Р*.

Испытуемый раствор S23. 100 мл раствора *S2* выпаривают досуха в вакууме при температуре 45^{0}С. Остаток растворяют в 2 мл *метиленхлорида подкисленного Р*.

Раствор сравнения (k). 60 мг *добавки к пластмассе 14 ФСО* растворяют в *метиленхлориде Р* и доводят объем тем же растворителем до 10 мл. 2,0 мл полученного раствора доводят *метиленхлоридом подкисленным Р* до объема 10,0 мл.

Раствор сравнения (l). 60 мг *добавки к пластмассе 15 ФСО* растворяют в *метиленхлориде Р* и доводят объем тем же растворителем до 10 мл. 2,0 мл полученного раствора доводят *метиленхлоридом подкисленным Р* до объема 10,0 мл.

Раствор сравнения (m). 60 мг *добавки к пластмассе 16 ФСО* растворяют в *метиленхлориде Р* и доводят объем тем же растворителем до 10 мл. 2,0 мл полученного раствора доводят *метиленхлоридом подкисленным Р* до объема 10,0 мл.

Раствор сравнения (n). 60 мг *добавки к пластмассе 17 ФСО* растворяют в *метиленхлориде Р* и доводят объем тем же растворителем до 10 мл. 2,0 мл полученного раствора доводят *метиленхлоридом подкисленным Р* до объема 10,0 мл.

Раствор сравнения (o). 60 мг *добавки к пластмассе 16 ФСО* и 60 мг *добавки к пластмассе 17 ФСО* растворяют в *метиленхлориде Р* и доводят объем тем же растворителем до 10 мл. 2,0 мл полученного раствора доводят *метиленхлоридом подкисленным Р* до объема 10,0 мл.

На линию старта хроматографической пластины наносят по 20 мкл испытуемого раствора S23, раствора сравнения (о) и растворов сравнения, которые соответствуют всем фенольным и нефенольным антиоксидантам, входящим в состав типового образца испытуемого материала. Помещают пластину в хроматографическую камеру, содержащую в качестве подвижной фазы *гексан Р*. Когда расстояние, прошедшее подвижной фазой от линии старта, составит 18 см, пластину вынимают из камеры, сушат на воздухе и снова помещают в камеру с *метиленхлоридом Р*. Когда расстояние, прошедшее подвижной фазой от линии старта, составит 17 см, пластину вынимают из камеры, сушат на воздухе и анализируют в УФ – свете при длине волны 254 нм. Опрыскивают *раствором йода спиртовым Р*

и через 10-15 мин анализируют в УФ – свете при длине волны 254 нм. На хроматограмме испытуемого раствора S23 какие-либо пятна должны быть не более интенсивными, чем пятна на хроматограммах растворов сравнения. Результаты анализа считаются достоверными, если на хроматограмме раствора сравнения (о) проявляются два четко разделенных пятна.

Амиды и стеараты. Определение проводят методом тонкослойной хроматографии *(2.2.27)*, используя две *ТСХ пластины со слоем силикагеля* GF_{254} *Р.*

Испытуемый раствор. Используют испытуемый раствор S23, приготовленный, как описано в испытании «Нефенольные антиоксиданты».

Раствор сравнения (р). 20 мг *кислоты стеариновой ФСО* (добавки к пластмассе 19) растворяют в *метиленхлориде Р* и доводят объем раствора тем же растворителем до 10 мл.

Раствор сравнения (q). 40 мг *олеамида ФСО* (добавки к пластмассе 20) растворяют в *метиленхлориде Р* и доводят объем раствора тем же растворителем до 20 мл.

Раствор сравнения (r). 40 мг *эрукамида ФСО* (добавки к пластмассе 21) растворяют в *метиленхлориде Р* и доводят объем раствора тем же растворителем до 20 мл.

На линию старта двух хроматографических пластин наносят по 10 мкл испытуемого раствора S23. На первую хроматографическую пластину наносят 10 мкл раствора сравнения *(р);* на другую пластину – по 10 мкл растворов сравнения *(q)* и *(r).*

Первую пластину помещают в камеру со смесью растворителей 25 объемов *этанола Р* и 75 объемов *триметилпентана Р*. Когда фронт растворителей пройдет 10 см от линии старта, пластину вынимают из камеры и сушат на воздухе. Опрыскивают раствором 2 г/л *дихлорфенолиндофенола натриевой соли Р* в *этаноле Р* и нагревают в сушильном шкафу при температуре 120^{0}С в течение нескольких минут до усиления интенсивности пятен. На хроматограмме испытуемого раствора S23 пятно, соответствующее добавке к пластмассе 19, должно быть идентично ему по расположению (R_f около 0,5) и не более интенсивным, чем пятно на хроматограмме раствора сравнения *(р).*

Другую пластину помещают в камеру с *гексаном Р*. Когда фронт растворителя пройдет 13 см от линии старта, пластину вынимают из камеры, сушат на воздухе и снова помещают в камеру со смесью растворителей 5 объемов *метанола Р* и 95 объемов *метиленхлорида Р*. Когда фронт растворителей пройдет 10 см от линии старта, пластину вынимают из камеры и сушат на воздухе. Опрыскивают раствором 40 г/л *кислоты фосфорномолибденовой Р* в *этаноле Р* и нагревают в сушильном шкафу при температуре 120^{0}С до появления пятен. На хроматограмме испытуемого раствора S23 пятно, соответствующее добавке к пластмассе 20 или 21, должно быть идентично ему по расположению (R_f около 0,2) и не более интенсивным, чем пятна на хроматограммах растворов сравнения *(q)* и *(r).*

3.1.6. ПОЛИПРОПИЛЕН ДЛЯ КОНТЕЙНЕРОВ И УКУПОРОЧНЫХ МАТЕРИАЛОВ ДЛЯ ПАРЕНТЕРАЛЬНЫХ И ОФТАЛЬМОЛОГИЧЕСКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Полипропилен состоит из гомополимера пропилена или сополимера пропилена с содержанием не более 25% этилена или смеси (сплава) полипропилена с содержанием не более 25% полиэтилена. Полимер может содержать добавки.

ПРОИЗВОДСТВО

В полимер вводят некоторое количество добавок для оптимизации его химических, физических и механических свойств с целью обеспечения использования полимера по назначению. Добавки выбирают из нижеперечисленного списка, в котором для каждой добавки обозначено максимально допустимое содержание.

Полимеры могут содержать не более трех антиоксидантов, один или несколько смазывающих или антиадгезивных агентов, а также титана диоксид как средство, придающее непрозрачность, чтобы защитить материал от света.

- бутилгидрокситолуол (добавка к пластмассе 07) (не больше 0,125%),
- пентаэритритилтетракис[3-(3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидроксифенил)пропионат] (добавка к пластмассе 09) (не более 0,3%),
- 1,3,5-трис(3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидроксибензил)-s-триазин-2,4,6(1H, 3H, 5H)-трион (добавка к пластмассе 13) (не более 0,3%),
- октадецил 3-(3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидроксифенил)пропионат (добавка к пластмассе 11) (не более 0,3%),
- этиленбис[3,3-бис[3-(1,1-диметилэтил)-4-гидроксифенил]бутаноат] (добавка к пластмассе 08) (не более 0,3%),
- диоктадецилдисульфид (добавка к пластмассе 15) (не более 0,3%),
- 2,2',2'',6,6',6''–гекса-*трет*-бутил-4,4',4''-[(2,4,6-триметил-1,3,5-бензентриил) трисметилен]трифенол (добавка к пластмассе 10) (не более 0,3%),
- 2,2'-бис(октадецилокси)-5,5'-спироби[1,3,2-диоксафосфинан] (добавка к пластмассе 14) (не более 0,3%),
- дидодецил 3,3'-тиодипропионат (добавка к пластмассе 16) (не более 0,3%),
- диоктадецил 3,3'-тиодипропионат (добавка к пластмассе 17) (не более 0,3%),
- трис[2,4-ди-*трет*-бутилфенил] фосфит (добавка к пластмассе 12) (не более 0,3%).

Сумма перечисленных выше антиоксидантных добавок не должна превышать 0,3%.

- гидротальцит (не более 0,5%),
- алканамиды (не более 0,5%),
- алкенамиды (не более 0,5%),
- натрия алюмосиликат (не более 0,5%),
- кремния диоксид (не более 0,5%),
- натрия бензоат (не более 0,5%),
- эфиры или соли жирных кислот (не более 0,5%),
- натрия фосфат (не более 0,5%),

- вазелиновое масло (не более 0,5%),
- цинка оксид (не более 0,5%),
- тальк (не более 0,5%),
- магния оксид (не более 0,2%),
- кальция стеарат или цинка стеарат или их сумма (не более 0,5%),
- титана диоксид (не более 4%), только для материалов, предназначенных для контейнеров для офтальмологических лекарственных средств.

Поставщик материала несет ответственность за то, чтобы качественный и количественный состав типового образца соответствовал качественному и количественному составу каждой произведенной серии.

ОПИСАНИЕ

Порошок, шарики, гранулы или, после трансформации, полупрозрачные пластинки разной толщины, или контейнеры. Практически нерастворимы в воде, этаноле, гексане и метаноле, растворимы в горячих ароматических углеводородах. Размягчаются при температуре около 120^{0}С.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ

Если необходимо, образцы испытуемого материала разрезают на части с максимальной длиной стороны не более 1 см.

А. К 0,25 г испытуемого материала прибавляют 10 мл *толуола Р* и кипятят с обратным холодильником в течение 15 мин. Несколько капель полученного горячего раствора помещают на диск натрия хлорида и выпаривают растворитель в сушильном шкафу при температуре 80^{0}С. Испытание проводят методом инфракрасной абсорбционной спектрометрии (*2.2.24*). Инфракрасный спектр испытуемого материала должен иметь максимумы при следующих волновых числах: 1375 см$^{-1}$, 1170 см$^{-1}$, 995 см$^{-1}$ и 970 см$^{-1}$. Полученный спектр должен соответствовать спектру типового образца. Если материал имеет форму пластины, идентификацию можно провести непосредственно на вырезанном фрагменте пластины соответствующего размера.

В. Испытуемый материал должен выдерживать дополнительные испытания в зависимости от тех добавок, которые входят в их состав, как обозначено в разделе «Испытания».

С. Около 20 мг испытуемого материала смешивают в платиновом тигле с 1 г *калия гидросульфата Р,* нагревают до полного расплавления и охлаждают. Добавляют 20 мл *кислоты серной разведенной Р*, аккуратно нагревают и фильтруют. К полученному фильтрату прибавляют 1 мл *кислоты фосфорной Р* и 1 мл *водорода пероксида раствора концентрированного Р.* Если испытуемый материал содержит титана диоксид, появляется оранжево-желтое окрашивание.

ИСПЫТАНИЯ

Если необходимо, образцы испытуемого материала разрезают на части с максимальной длиной стороны не более 1 см.

Раствор S1. *Раствор S1 используют в течение 4 ч после приготовления.* 25 г испытуемого материала помещают в колбу из боросиликатного стекла с притертой пробкой. Прибавляют 500 мл *воды для инъекций Р* и кипятят с обратным холодильником в течение 5 ч. Охлаждают и декантируют. Часть раствора сохраняют для проведения испытаний внешнего вида раствора. Остаток раствора фильтруют через стеклянный фильтр (16).

Раствор S2. 2,0 г испытуемого материала помещают в коническую колбу из боросиликатного стекла с притертой пробкой. Прибавляют 80 мл *толуола Р* и кипятят с обратным холодильником при постоянном перемешивании в течение 90 мин. Охлаждают до температуры 60^{0}С и продолжают прибавление 120 мл *толуола Р* при перемешивании. Раствор фильтруют через стеклянный фильтр (16). Колбу и фильтр промывают 25 мл смеси *толуола Р – метанола Р* (40:60), прибавляют ее к фильтрату и доводят объем полученного раствора той же смесью растворителей до 250 мл. Готовят контрольный раствор.

Раствор S3. 100 г испытуемого материала помещают в коническую колбу из боросиликатного стекла с притертой пробкой и прибавляют 250 мл *0,1 М раствора кислоты хлористоводородной*. Кипятят с обратным холодильником при постоянном перемешивании в течение 1 ч. Охлаждают и декантируют раствор.

Внешний вид раствора. Раствор S1 может иметь опалесценцию не более чем суспензия сравнения II (*2.2.1*) и должен быть бесцветным (*2.2.2, Метод II*).

Кислотность или щелочность. К 100 мл раствора S1 прибавляют 0,15 мл *раствора BRP индикатора Р*. Для изменения окраски раствора на синюю должно потребоваться не более 1,5 мл *0,01 М раствора натрия гидроксида*. К 100 мл раствора S1 прибавляют 0,2 мл *раствора метилового оранжевого Р*. Для изменения окраски раствора на желтую или оранжевую должно потребоваться не более 1,0 мл *0,01 М раствора кислоты хлористоводородной.*

Оптическая плотность (*2.2.25*). Оптическая плотность раствора S1 в области от 220 нм до 340 нм не должна превышать 0,2.

Восстановители. К 20,0 мл раствора S1 прибавляют 1 мл *кислоты серной разведенной Р* и 20,0 мл *0,002 М раствора калия перманганата*. Кипятят с обратным холодильником в течение 3 мин и немедленно охлаждают. Прибавляют 1 г *калия иодида Р* и немедленно титруют *0,01 М раствором натрия тиосульфата*, используя в качестве индикатора 0,25 мл *раствора крахмала Р*. Параллельно проводят контрольный опыт. Разность между объемами титранта не должна превышать 0,5 мл.

Вещества, растворимые в гексане. 10 г испытуемого материала помещают в коническую колбу из боросиликатного стекла с притертой пробкой вместимостью 250 мл. Прибавляют 100 мл *гексана Р* и кипятят с обратным холодильником в течение 4 ч при постоянном перемешивании. Охлаждают в ледяной бане и быстро фильтруют через стеклянный фильтр (16), поддерживая температуру раствора около 0^{0}С (время фильтрования должно составлять менее 5 мин; для ускорения процесса, если необходимо, фильтрование проводят под давлением). 20 мл фильтрата помещают в высушенный до постоянной массы стакан из боросиликатного стекла и выпаривают на водяной бане. Остаток сушат в сушильном шкафу при температуре от 100^{0}С до 105^{0}С в течение 1 ч. Масса полученного остатка

должна быть в пределах 10% от массы остатка, полученного для типового образца, и не должна превышать 5%.

Экстрагируемый алюминий. Не более 1 ppm экстрагируемого Al. Определение проводят методом атомно-эмиссионной спектрометрии в среде аргона (*2.2.22, Метод I).*

Испытуемый раствор. Используют раствор S3.

Раствор сравнения. Готовят разбавлением *эталонного раствора алюминия (200 ppm Al) Р 0,1 М раствором кислоты хлористоводородной*.

Измеряют интенсивность светоиспускания алюминия при длине волны 396,15 нм, регулируя спектральный фон на уровне 396,25 нм.

Проверяют отсутствие алюминия в используемой кислоте хлористоводородной.

Экстрагируемый хром. Не более 0,05 ppm экстрагируемого Cr. Определение проводят методом атомно-эмиссионной спектрометрии в среде аргона *(2.2.22, Метод I).*

Испытуемый раствор. Используют раствор S3.

Раствор сравнения. Готовят разбавлением *эталонного раствора хрома (100 ppm Cr) Р* смесью *кислоты хлористоводородной Р* и *воды Р* (2:8).

Измеряют интенсивность светоиспускания алюминия при длине волны 205,55 нм, регулируя спектральный фон на уровне 205,50 нм.

Проверяют отсутствие хрома в используемой кислоте хлористоводородной.

Экстрагируемый титан. Не более 1 ppm экстрагируемого Ti. Определение проводят методом атомно-эмиссионной спектрометрии в среде аргона *(2.2.22, Метод I).*

Испытуемый раствор. Используют раствор S3.

Раствор сравнения. Готовят разбавлением *эталонного раствора титана (100 ppm Ti) Р 0,1 М раствором кислоты хлористоводородной*.

Измеряют интенсивность светоиспускания титана при длине волны 336,12 нм, регулируя спектральный фон на уровне 336,16 нм.

Проверяют отсутствие титана в используемой кислоте хлористоводородной.

Экстрагируемый ванадий. Не более 0,1 ppm экстрагируемого V. Определение проводят методом атомно-эмиссионной спектрометрии в среде аргона *(2.2.22, Метод I).*

Испытуемый раствор. Используют раствор S3.

Раствор сравнения. Готовят разбавлением *эталонного раствора ванадия (1 г/л V) Р* смесью *кислоты хлористоводородной Р* и *воды Р* (2:8).

Измеряют интенсивность светоиспускания при длине волны 292,40 нм, регулируя спектральный фон на уровне 292,35 нм.

Проверяют отсутствие ванадия в используемой кислоте хлористоводородной.

Экстрагируемый цинк. Не более 1 ppm экстрагируемого Zn. Определение проводят методом атомно-абсорбционной спектрометрии (*2.2.23, Метод I*).

Испытуемый раствор. Используют раствор S3.

Раствор сравнения. Готовят разбавлением *эталонного раствора цинка (10 ppm Zn) Р 0,1 М раствором кислоты хлористоводородной*.

Измеряют оптическую плотность при длине волны 213,9 нм, используя в качестве источника излучения лампу с полым цинковым катодом и воздушно-ацетиленовое пламя.

Проверяют отсутствие цинка в используемой кислоте хлористоводородной.

Экстрагируемые тяжелые металлы (*2.4.8*). 50 мл раствора S3 упаривают до объема около 5 мл на водяной бане и доводят объем раствора *водой Р* до 20,0 мл. 12 мл полученного раствора выдерживают испытание А на тяжелые металлы (2,5 ppm). Эталонный раствор готовят с использованием 2,5 мл *эталонного раствора свинца (10 ppm Pb) Р*.

Сульфатная зола (*2.4.14*). Не более 1,0%. Определение проводят из 5,0 г испытуемого материала. Этот предел не распространяется на материалы, которые содержат титана диоксид как добавку, придающую непрозрачность материалу.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ ИСПЫТАНИЯ

Эти испытания следует проводить полностью или частично только в тех случаях, когда этого требует заявленный состав или область применения материала.

Фенольные антиоксиданты. Определение проводят методом жидкостной хроматографии (*2.2.29*).

Условия хроматографирования:

- колонка из нержавеющей стали размером 0,25 м × 4,6 мм, заполненная сорбентом *силикагель октадецилсилильный для хроматографии Р* с размером частиц 5 мкм,
- подвижная фаза: одна из 3 следующих смесей:

Подвижная фаза 1 со скоростью 2 мл/мин: 30 объемов *воды Р*, 70 объемов *ацетонитрила Р,*

Подвижная фаза 2 со скоростью 1,5 мл/мин: 10 объемов *воды Р*, 30 объемов *тетрагидрофурана Р*, 60 объемов *ацетонитрила Р,*

Подвижная фаза 3 со скоростью 1,5 мл/мин: 5 объемов *воды Р*, 45 объемов *2-пропанола Р*, 50 объемов *метанола Р,*

- детектор спектрофотометрический с длиной волны 280 нм.

Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

- коэффициент разделения пиков добавок к пластмассе 07 и 08 при использовании подвижной фазы 1 должен быть не менее 8,0,
- коэффициент разделения пиков добавок к пластмассе 09 и 10 при использовании подвижной фазы 2 должен быть не менее 2,0,
- коэффициент разделения пиков добавок к пластмассе 11 и 12 при использовании подвижной фазы 3 должен быть не менее 2,0.

Испытуемый раствор S21. 50 мл раствора S2 выпаривают досуха в вакууме при температуре 45^{0}С. Остаток растворяют в 5,0 мл смеси равных объемов *ацетонитрила R* и *тетрагидрофурана R*. Контрольный раствор готовят из контрольного раствора, соответствующего раствору S2.

Испытуемый раствор S22. 50 мл раствора S2 выпаривают досуха в вакууме при температуре 45^{0}С. Остаток растворяют в 5,0 мл *метиленхлорида Р*. Контрольный раствор готовят из контрольного раствора, соответствующего раствору S2.

Из приведенных ниже растворов сравнения готовят только те, которые необходимы для анализа фенольных антиоксидантов, входящих в состав испытуемого материала.

Раствор сравнения (а). 25,0 мг *бутилгидрокситолуола ФСО* (добавка к пластмассе 07) и 60,0 мг *добавки к пластмассе 08 ФСО* растворяют в 10 мл смеси равных объемов *ацетонитрила Р* и *тетрагидрофурана Р*. 2,0 мл полученного раствора доводят смесью равных объемов *ацетонитрила Р* и *тетрагидрофурана Р* до объема 50,0 мл.

Раствор сравнения (в). 60,0 мг *добавки к пластмассе 09 ФСО* и 60,0 мг *добавки к пластмассе 10 ФСО* растворяют в 10 мл смеси равных объемов *ацетонитрила Р* и *тетрагидрофурана Р*. 2,0 мл полученного раствора доводят суммой равных объемов *ацетонитрила Р* и *тетрагидрофурана Р* до объема 50,0 мл.

Раствор сравнения (с). 60,0 мг *добавки к пластмассе 11 ФСО* и 60,0 мг *добавки к пластмассе 12 ФСО* растворяют в 10 мл *метиленхлорида Р*. 2,0 мл полученного раствора доводят *метиленхлоридом Р* до объема 50,0 мл.

Раствор сравнения (d). 25,0 мг *добавки к пластмассе 07 ФСО* растворяют в 10 мл смеси равных объемов *ацетонитрила Р* и *тетрагидрофурана Р*. 2,0 мл полученного раствора доводят смесью равных объемов *ацетонитрила Р* и *тетрагидрофурана Р* до объема 50,0 мл.

Раствор сравнения (е). 60,0 мг *добавки к пластмассе 08 ФСО* растворяют в 10 мл смеси равных объемов *ацетонитрила Р* и *тетрагидрофурана Р*. 2,0 мл полученного раствора доводят смесью равных объемов *ацетонитрила Р* и *тетрагидрофурана Р* до объема 50,0 мл.

Раствор сравнения (f). 60,0 мг *добавки к пластмассе 13 ФСО* растворяют в 10 мл смеси равных объемов *ацетонитрила Р* и *тетрагидрофурана Р*. 2,0 мл полученного раствора доводят смесью равных объемов *ацетонитрила Р* и *тетрагидрофурана Р* до объема 50,0 мл.

Раствор сравнения (g). 60,0 мг *добавки к пластмассе 09 ФСО* растворяют в 10 мл смеси равных объемов *ацетонитрила Р* и *тетрагидрофурана Р*. 2,0 мл полученного раствора доводят смесью равных объемов *ацетонитрила Р* и *тетрагидрофурана Р* до объема 50,0 мл.

Раствор сравнения (h). 60,0 мг *добавки к пластмассе 10 ФСО* растворяют в 10 мл смеси равных объемов *ацетонитрила Р* и *тетрагидрофурана Р*. 2,0 мл полученного раствора доводят смесью равных объемов *ацетонитрила Р* и *тетрагидрофурана Р* до объема 50,0 мл.

Раствор сравнения (i). 60,0 мг *добавки к пластмассе 11 ФСО* растворяют в 10 мл *метиленхлорида Р*. 2,0 мл полученного раствора доводят *метиленхлоридом Р* до объема 50,0 мл.

Раствор сравнения (j). 60,0 мг *добавки к пластмассе 12 ФСО* растворяют в 10 мл *метиленхлорида Р*. 2,0 мл полученного раствора доводят *метиленхлоридом Р* до объема 50,0 мл.

Если испытуемый материал содержит добавку к пластмассе 07 и/или добавку 08, используют подвижную фазу 1. Хроматографируют по 20 мкл испытуемого раствора S21, соответствующего контрольного раствора, растворов сравнения (a), (d) или (e) или растворов сравнения (d) или (e).

Если испытуемый материал содержит один или более из следующих антиоксидантов:
- добавка к пластмассе 09,
- добавка к пластмассе 10,
- добавка к пластмассе 11,
- добавка к пластмассе 12,
- добавка к пластмассе 13,

используют подвижную фазу 2. Хроматографируют по 20 мкл испытуемого раствора S21, соответствующего контрольного раствора, раствора сравнения (b) и растворов сравнения антиоксидантов из вышеперечисленного перечня, которые входят в состав испытуемого материала.

Если испытуемый материал содержит добавку к пластмассе 11 и/или добавку 12, используют подвижную фазу 3. Хроматографируют по 20 мкл испытуемого раствора S22, соответствующего контрольного раствора, растворов сравнения (c), (i) или (j) или растворов сравнения (i) или (j).

Во всех случаях время хроматографирования должно составлять 30 минут. На хроматограммах испытуемых растворов S21 и S22 могут появляться только пики антиоксидантов, которые входят в состав испытуемого материала, и дополнительные пики, которые также могут появляться на хроматограммах соответствующего контрольного раствора. На хроматограммах испытуемых растворов S21 и S22 площади пиков не должны превышать площади пиков на хроматограммах растворов сравнения (d) – (j).

Нефенольные антиоксиданты. Определение проводят методом тонкослойной хроматографии (*2.2.27*), используя *ТСХ пластину со слоем силикагеля* GF_{254} *Р*.

Испытуемый раствор S23. 100 мл раствора *S2* выпаривают досуха в вакууме при температуре 45^{0}С. Остаток растворяют в 2 мл *метиленхлорида подкисленного Р*.

Раствор сравнения (k). 60 мг *добавки к пластмассе 14 ФСО* растворяют в *метиленхлориде Р* и доводят объем тем же растворителем до 10 мл. 2,0 мл полученного раствора доводят *метиленхлоридом подкисленным Р* до объема 10,0 мл.

Раствор сравнения (l). 60 мг *добавки к пластмассе 15 ФСО* растворяют в *метиленхлориде Р* и доводят объем тем же растворителем до 10 мл. 2,0 мл полученного раствора доводят *метиленхлоридом подкисленным Р* до объема 10,0 мл.

Раствор сравнения (m). 60 мг *добавки к пластмассе 16 ФСО* растворяют в *метиленхлориде Р* и доводят объем тем же растворителем до 10 мл. 2,0 мл полученного раствора доводят *метиленхлоридом подкисленным Р* до объема 10,0 мл.

Раствор сравнения (n). 60 мг *добавки к пластмассе 17 ФСО* растворяют в *метиленхлориде Р* и доводят объем тем же растворителем до 10 мл. 2,0 мл полученного раствора доводят *метиленхлоридом подкисленным Р* до объема 10,0 мл.

Раствор сравнения (o). 60 мг *добавки к пластмассе 16 ФСО* и 60 мг *добавки к пластмассе 17 ФСО* растворяют в *метиленхлориде Р* и доводят объем тем же растворителем до 10 мл. 2,0 мл полученного раствора доводят *метиленхлоридом подкисленным Р* до объема 10,0 мл.

На линию старта хроматографической пластины наносят по 20 мкл испытуемого раствора S23, раствора сравнения (o) и растворов сравнения, которые соответствуют всем фенольным и нефенольным антиоксидантам, входящим в состав типового образца испытуемого материала. Помещают пластину в хроматографическую камеру, содержащую в качестве подвижной фазы *гексан Р*. Когда расстояние, прошедшее подвижной фазой от линии старта, составит 18 см, пластину вынимают из камеры, сушат на воздухе и снова помещают в камеру с *метиленхлоридом Р*. Когда расстояние, прошедшее подвижной фазой от линии старта, составит 17 см, пластину вынимают из камеры, сушат на воздухе и анализируют в УФ – свете при длине волны 254 нм. Опрыскивают *раствором йода спиртовым Р* и через 10-15 минут анализируют в УФ – свете при длине волны 254 нм. На хроматограмме испытуемого раствора S23 какие-либо пятна должны быть не более интенсивными, чем пятна на хроматограммах растворов сравнения. Результаты анализа считаются достоверными, если на хроматограмме раствора сравнения (o) проявляются два четко разделенных пятна.

Амиды и стеараты. Определение проводят методом тонкослойной хроматографии (2.2.27), используя две *ТСХ пластины со слоем силикагеля* GF_{254} *Р*.

Испытуемый раствор. Используют испытуемый раствор S23, приготовленный, как описано в испытании «Нефенольные антиоксиданты».

Раствор сравнения (р). 20 мг *кислоты стеариновой ФСО* (добавки к пластмассе 19) растворяют в *метиленхлориде Р* и доводят объем раствора тем же растворителем до 10 мл.

Раствор сравнения (q). 40 мг *олеамида ФСО* (добавки к пластмассе 20) растворяют в *метиленхлориде Р* и доводят объем раствора тем же растворителем до 20 мл.

Раствор сравнения (r). 40 мг *эрукамида ФСО* (добавки к пластмассе 21) растворяют в *метиленхлориде Р* и доводят объем раствора тем же растворителем до 20 мл.

На линию старта двух хроматографических пластин наносят по 10 мкл испытуемого раствора S23. На первую хроматографическую пластину наносят 10 мкл раствора сравнения *(р);* на другую пластину – по 10 мкл растворов сравнения *(q)* и *(r).*

Первую пластину помещают в камеру со смесью растворителей 25 объемов *этанола Р* и 75 объемов *триметилпентана Р*. Когда фронт растворителей пройдет 10 см от линии старта, пластину вынимают из камеры и сушат на воздухе. Опрыскивают раствором 2 г/л *дихлорфенолиндофенола натриевой соли Р* в *этаноле Р* и нагревают в сушильном шкафу при температуре 120^{0}С в течение нескольких минут для усиления интенсивности пятен. На хроматограмме испытуемого раствора S23 пятно, соответствующее добавке к пластмассе 19, должно быть идентично ему по расположению (R_f около 0,5) и не более интенсивным, чем пятно на хроматограмме раствора сравнения *(р).*

Другую пластину помещают в камеру с *гексаном Р*. Когда фронт растворителя пройдет 13 см от линии старта, пластину вынимают из камеры, сушат на воздухе и снова помещают в камеру со смесью растворителей 5 объемов *метанола Р* и 95 объемов *метиленхлорида Р*. Когда фронт растворителей пройдет 10 см от линии старта, пластину вынимают из камеры и сушат на воздухе. Опрыскивают раствором 40 г/л *кислоты фосфорномолибденовой Р* в *этаноле Р* и нагревают в сушильном шкафу при температуре 120^{0}С до появления пятен. На хроматограмме испытуемого раствора S23 пятно, соответствующее добавке к пластмассе 20 или 21, должно быть идентично ему по расположению (R_f около 0,2) и не более интенсивным, чем пятна на хроматограммах растворов сравнения *(q)* и *(r).*

3.1.7. ПОЛИЭТИЛЕНВИНИЛАЦЕТАТ ДЛЯ КОНТЕЙНЕРОВ И ТРУБОК ДЛЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ ДЛЯ ПАРЕНТЕРАЛЬНОГО ПИТАНИЯ

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Полиэтиленвинилацетат, отвечающий нижеперечисленным требованиям, подходит для изготовления контейнеров и трубок для лекарственных средств для парентерального питания.

Полиэтиленвинилацетат получают сополимеризацией смеси этилена и винилацетата. Этот полимер содержит определенное количество винилацетата, не более 25% для материала, предназначенного для производства контейнеров, и не более 30% для материала, предназначенного для производства трубок.

ПРОИЗВОДСТВО

В полимер вводят некоторое количество добавок для оптимизации его химических, физических и механических свойств с целью обеспечения использования полимера по назначению. Добавки выбирают из нижеперечисленного списка, в котором для каждой добавки обозначено максимально допустимое содержание.

Полимеры могут содержать не более трех из следующих антиоксидантов:

- бутилгидрокситолуол (добавка к пластмассе 07) (не более 0,125%),
- пентаэритритилтетракис[3-(3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксифенил)пропионат] (добавка к пластмассе 09) (не более 0,2%),
- октадецил 3-(3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидроксифенил)пропионат (добавка к пластмассе 11) (не более 0,2%),
- трис[2,4-ди-*трет*-бутилфенил] фосфит (добавка к пластмассе 12) (не более 0,2%),
- 2,2',2'',6,6',6''–гекса-*трет*-бутил-4,4',4''-[(2,4,6-триметил-1,3,5-бензотриил) трисметилен]трифенол (добавка к пластмассе 10) (не более 0,2%).

Полимер также может содержать:

- олеамид (добавка к пластмассе 20) (не более 0,5%),
- эрукамид (добавка к пластмассе 21) (не более 0,5%),
- кальция стеарат или цинка стеарат или сумму этих компонентов (не более 0,5%),
- кальция карбонат или калия гидроксид (не более 0,5% каждого),
- кремния диоксид коллоидный (не более 0,2%).

Поставщик материала несет ответственность за то, чтобы качественный и количественный состав типового образца соответствовал качественному и количественному составу каждой произведенной серии.

ОПИСАНИЕ

Шарики, гранулы или, после трансформации, полупрозрачные пластинки разной толщины, или трубки разной толщины, или образцы готовых изделий, практически нерастворимы в воде, этаноле, метаноле и гексане, который, однако, растворяет низкомолекулярные полимеры, растворимы в горячих ароматических углеводородах. При сжигании пламя окрашивается в синий цвет. Температура размягчения испытуемого материала изменяется в зависимости от содержания винилацетата; она снижается от приблизительно 100^0C – при содержании нескольких процентов винилацетата – до приблизительно 70^0C – при содержании 30% винилацетата.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ

Если необходимо, образцы испытуемого материала разрезают на части с максимальной длиной стороны не более 1 см.

К 0,25 г испытуемого материала прибавляют 10 мл *толуола Р* и кипятят с обратным холодильником в течение 15 мин. Несколько капель полученного раствора помещают на диск натрия хлорида и выпаривают растворитель в сушильном шкафу при температуре 80^{0}С. Испытание проводят методом инфракрасной абсорбционной спектрометрии (*2.2.24*). Инфракрасный спектр испытуемого материала должен иметь максимумы, соответствующие винилацетату, при следующих волновых числах: 1740 см$^{-1}$, 1375 см$^{-1}$, 1240 см$^{-1}$, 1020 см$^{-1}$, 610 см$^{-1}$, 720 см$^{-1}$, и максимумы, соответствующие этилену, при 2920 см$^{-1}$, 2850 см$^{-1}$, 1470 см$^{-1}$, 1460 см$^{-1}$, 1375 см$^{-1}$, 730 см$^{-1}$, 720 см$^{-1}$. Полученный спектр должен соответствовать спектру типового образца. Если материал имеет форму пластины, идентификацию можно провести непосредственно на вырезанном фрагменте пластинки соответствующего размера.

ИСПЫТАНИЯ

Если необходимо, образцы испытуемого материала разрезают на части с максимальной длиной стороны не более 1 см.

Раствор S1. 2,0 г испытуемого материала помещают в коническую колбу из боросиликатного стекла с притертой пробкой. Прибавляют 80 мл *толуола Р* и кипятят с обратным холодильником при постоянном перемешивании в течение 90 мин. Охлаждают до температуры 60^{0}С и прибавляют 120 мл *толуола Р* при постоянном перемешивании. Раствор фильтруют через стеклянный фильтр (16). Колбу и фильтр промывают 25 мл смеси *толуола Р – метанола Р* (40:60), прибавляют ее к фильтрату и доводят объем полученного раствора той же смесью растворителей до 250 мл.

Раствор S2. *Раствор S2 используют в течение 4 ч после приготовления.* 25 г испытуемого материала помещают в колбу из боросиликатного стекла с притертой пробкой. Прибавляют 500 мл *воды для инъекций Р* и кипятят с обратным холодильником в течение 5 ч. Охлаждают и декантируют. Часть раствора сохраняют для проведения испытаний внешнего вида. Остаток раствора фильтруют через стеклянный фильтр (16).

Внешний вид раствора S2. Раствор S2 должен быть прозрачным (*2.2.1*) и бесцветным (*2.2.2, Метод II*).

Кислотность или щелочность. К 100 мл раствора S2 прибавляют 0,15 мл *раствора BRP индикатора Р*. Для изменения окраски раствора на синюю должно потребоваться не более 1,0 мл *0,01 М раствора натрия гидроксида*. К 100 мл раствора S2 прибавляют 0,2 мл *раствора метилового оранжевого Р*. Для изменения окраски раствора на желтую или оранжевую должно потребоваться не более 1,5 мл *0,01 М раствора кислоты хлористоводородной.*

Оптическая плотность (*2.2.25*). Оптическая плотность раствора S2 в области от 220 нм до 340 нм не должна превышать 0,2.

Восстановители. К 20,0 мл раствора S2 прибавляют 1 мл *кислоты серной разведенной Р* и 20,0 мл *0,002 М раствора калия перманганата*. Кипятят с обратным холодильником в течение 3 мин и сразу охлаждают. Прибавляют 1 г *калия иодида Р* и немедленно титруют *0,01 М раствором натрия тиосульфата*, используя в качестве индикатора 0,25 мл *раствора крахмала Р*. Параллельно про-

водят контрольный опыт. Разность между объемами титранта не должна превышать 0,5 мл.

Амиды и стеариновая кислота. Определение проводят методом тонкослойной хроматографии (*2.2.27*), используя две *ТСХ пластины со слоем силикагеля* GF_{254} *Р*.

Испытуемый раствор. 100 мл раствора S1 выпаривают досуха в вакууме при температуре 45^{0}С. Остаток растворяют в 2 мл *метиленхлорида подкисленного Р.*

Раствор сравнения (а). 20 мг *кислоты стеариновой ФСО* (добавки к пластмассе 19) растворяют в 10 мл *метиленхлорида Р*.

Раствор сравнения (b). 40 мг *добавки к пластмассе 20 ФСО* растворяют в 10 мл *метиленхлорида Р*. 1 мл полученного раствора доводят *метиленхлоридом Р* до объема 5 мл.

Раствор сравнения (с). 40 мг *добавки к пластмассе 21 ФСО* растворяют в 10 мл *метиленхлорида Р*. 1 мл полученного раствора доводят *метиленхлоридом Р* до объема 5 мл.

На линию старта двух хроматографических пластин наносят по 10 мкл каждого раствора. На первую хроматографическую пластину наносят 10 мкл раствора сравнения *(р);* на другую пластину – по 10 мкл растворов сравнения *(q)* и *(r).*

Первую пластину помещают в камеру со смесью растворителей 25 объемов *этанола Р* и 75 объемов *триметилпентана Р*. Когда фронт растворителей пройдет 10 см от линии старта, пластину вынимают из камеры и сушат на воздухе. Опрыскивают раствором 2 г/л *дихлорфенолиндофенола натриевой соли Р* в *этаноле Р* и нагревают в сушильном шкафу при температуре 120^{0}С в течение нескольких минут до усиления интенсивности пятен. На хроматограмме испытуемого раствора пятно, соответствующее добавке к пластмассе 19, должно быть не более интенсивным, чем пятно на хроматограмме раствора сравнения *(а).*

Другую пластину помещают в камеру с *гексаном Р*. Когда фронт растворителя пройдет 13 см от линии старта, пластину вынимают из камеры, сушат на воздухе и снова помещают в камеру со смесью растворителей 5 объемов *метанола Р* и 95 объемов *метиленхлорида Р*. Когда фронт растворителей пройдет 10 см от линии старта, пластину вынимают из камеры и сушат на воздухе. Опрыскивают раствором 40 г/л *кислоты фосфорномолибденовой Р* в *этаноле Р* и нагревают в сушильном шкафу при температуре 120^{0}С до появления пятен. На хроматограмме испытуемого раствора пятна, соответствующие добавкам к пластмассе 20 или 21, должны быть не более интенсивными, чем пятна на хроматограммах растворов сравнения *(b)* и *(с)* соответственно.

Фенольные антиоксиданты. Определение проводят методом жидкостной хроматографии (*2.2.29*).

Испытуемый раствор (а). 50 мл раствора S1 выпаривают досуха в вакууме при температуре 45^{0}С. Остаток растворяют в 5,0 мл смеси равных объемов *ацетонитрила Р* и *тетрагидрофурана Р*.

Испытуемый раствор (b). 50 мл раствора S1 выпаривают досуха в вакууме при температуре 45^{0}С. Остаток растворяют в 5,0 мл *метиленхлорида Р*.

Раствор сравнения (a). 25 мг *бутилгидрокситолуола ФСО* (добавка к пластмассе 07), 40 мг *добавки к пластмассе 10 ФСО*, 40 мг *добавки к пластмассе 09 ФСО* и 40 мг *добавки к пластмассе 11 ФСО* растворяют в 10 мл смеси равных объемов *ацетонитрила Р* и *тетрагидрофурана Р*. 2 мл полученного раствора доводят смесью равных объемов *ацетонитрила Р* и *тетрагидрофурана Р* до объема 50,0 мл.

Раствор сравнения (b). 40 мг *добавки к пластмассе 11 ФСО* и 40 мг *добавки к пластмассе 12 ФСО* растворяют в 10 мл *метиленхлорида Р*. 2 мл полученного раствора доводят *метиленхлоридом Р* до объема 50,0 мл.

Условия хроматографирования:

- колонка из нержавеющей стали размером 0,25 м × 4,6 мм, заполненная *силикагелем октадецилсилильным для хроматографии Р* с размером частиц 5 мкм,
- подвижная фаза: одна из 2 следующих смесей со скоростью 1,5 мл/мин:

Подвижная фаза 1: 10 объемов *воды Р*, 30 объемов *тетрагидрофурана Р*, 60 объемов *ацетонитрила Р,*

Подвижная фаза 2: 5 объемов *воды Р*, 45 объемов *2-пропанола Р*, 50 объемов *метанола Р,*

- детектор спектрофотометрический с длиной волны 280 нм.

Используя подвижную фазу 1, хроматографируют по 20 мкл испытуемого раствора (a) и раствора сравнения (a). На хроматограмме испытуемого раствора (a) могут проявиться только основные пики, соответствующие пикам на хроматограмме раствора сравнения (a) со временем удерживания больше 2 мин.

На хроматограмме испытуемого раствора (a) площади пиков не должны превышать площади соответствующих пиков на хроматограмме раствора сравнения (a), исключая последний пик на хроматограмме раствора сравнения (a).

Хроматографическая система считается пригодной при использовании подвижной фазы 1, если выполняются следующие условия:

- число теоретических тарелок, рассчитанных для пика добавки к пластмассе 07, должно быть не менее 2500,
- коэффициент разделения пиков добавок к пластмассе 09 и 10 должен быть не менее 2,0.

Если на хроматограмме испытуемого раствора (a) проявляется пик с таким же самым временем удерживания, как у последнего пика на хроматограмме раствора сравнения (a), используют подвижную фазу 2.

Хроматографируют по 20 мкл испытуемого раствора (b) и раствора сравнения (b). На хроматограмме испытуемого раствора (b) могут проявляться только основные пики, соответствующие пикам на хроматограмме раствора сравнения (b) со временем удерживания более 3 мин.

На хроматограмме испытуемого раствора (b) площади пиков не должны превышать площадей соответствующих пиков на хроматограмме раствора сравнения (b).

Хроматографическая система считается пригодной, если коэффициент разделения пиков добавок к пластмассе 11 и 12 не менее 2,0.

Вещества, растворимые в гексане. 5 г испытуемого материала помещают в коническую колбу из боросиликатного стекла с притертой пробкой. Прибавляют 50 мл *гексана Р* и кипятят с обратным холодильником в течение 4 ч при постоянном перемешивании. Охлаждают в ледяной бане; может образоваться гель.

К стеклянному фильтру (16), снабженному установкой для фильтрования в вакууме, присоединяют охлаждающую оболочку, заполненную ледяной водой, и охлаждают фильтр в течение 15 мин. Содержимое конической колбы фильтруют через охлажденный фильтр под давлением 27 кПа, не промывая осадок; время фильтрования не должно превышать 5 мин. 20 мл фильтрата выпаривают досуха на водяной бане и высушивают при температуре 100^0С в течение 1 ч. Масса полученного остатка не должна превышать 40 мг (2%) для сополимера, используемого для производства контейнеров, и не должна превышать 0,1 г (0,5%) для сополимера, используемого для производства трубок.

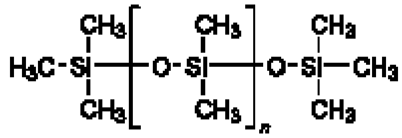
Сульфатная зола (*2.4.14*). Не более 1,2%. Определение проводят из 5,0 г испытуемого материала.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ

От 0,250 г до 1,000 г испытуемого материала в зависимости от содержания винилацетата в сополимере помещают в коническую колбу с притертой пробкой вместимостью 300 мл с магнитной мешалкой. Прибавляют 40 мл *ксилола Р*. Кипятят с обратным холодильником при перемешивании в течение 4 ч. Охлаждают при непрерывном перемешивании до начала образования осадка и медленно прибавляют 25,0 мл *раствора калия гидроксида спиртового Р1*. Снова кипятят с обратным холодильником при перемешивании в течение 3 ч. Охлаждают при постоянном перемешивании, промывают холодильник 50 мл *воды Р* и прибавляют в колбу 30,0 мл *0,05 М раствора кислоты серной*. Содержимое колбы переносят в лабораторный стакан вместимостью 400 мл. Колбу ополаскивают двумя порциями по 50 мл раствора 200 г/л *натрия сульфата безводного Р* и тремя порциями по 20 мл *воды Р* и прибавляют смывы в тот же лабораторный стакан. Титруют избыток серной кислоты *0,1 М раствором натрия гидроксида*, определяя точку конца титрования потенциометрическим методом (*2.2.20*). Параллельно проводят контрольный опыт.

1 мл *0,05 М раствора кислоты серной* соответствует 8,609 мг винилацетата.

3.1.8. СИЛИКОНОВОЕ МАСЛО, ИСПОЛЬЗУЕМОЕ В КАЧЕСТВЕ СМАЗЫВАЮЩЕЙ ДОБАВКИ



ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Силиконовое масло, используемое в качестве смазывающей добавки, представляет собой полидиметилсилоксан, полученный гидролизом и поликонденсацией дихлордиметилсилана и хлортриметилсилана. Существуют разные сорта силиконового масла, которые характеризуются числом, обозначающим величину его номинальной вязкости и которое располагается после наименования.

Степень полимеризации силиконовых масел, используемых в качестве смазывающих добавок (n = от 400 до 1200), может быть такой, чтобы их кинематическая вязкость находилась в номинальных пределах от 1000 $мм^2·с^{-1}$ до 30000 $мм^2·с^{-1}$.

ОПИСАНИЕ

Прозрачные, бесцветные растворы разной вязкости, практически нерастворимые в воде и метаноле, смешиваемые с этилацетатом, метилэтилкетоном и толуолом, очень мало растворимые в этаноле.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ

А. Испытуемый материал должен отвечать требованиям кинематической вязкости при температуре 25^0С, как указано в разделе «Испытания».

В. Испытание проводят методом инфракрасной абсорбционной спектрометрии (*2.2.24*). Инфракрасный спектр испытуемого материала должен соответствовать спектру *силиконового масла ФСО*. Область спектра от 850 $см^{-1}$ до 750 $см^{-1}$ не принимают во внимание, поскольку в ней могут выявляться незначительные различия, обусловленные степенью полимеризации.

С. 0,5 г испытуемого материала помещают в пробирку и нагревают над небольшим огнем до появления белых паров. Пробирку переворачивают над другой пробиркой, которая содержит 1 мл раствора 1 г/л *хромотроповой кислоты натриевой соли Р* в *кислоте серной Р*, таким образом, чтобы пар достиг раствора. Другую пробирку встряхивают в течение около 10 с и нагревают на водяной бане в течение 5 мин. Раствор становится фиолетовым.

D. Сульфатная зола (*2.4.14*), полученная в платиновом тигле из 50 мг испытуемого материала, представляет собой белый порошок, который дает реакцию на силикаты (*2.3.1*).

ИСПЫТАНИЯ

Кислотность. К 2,0 г испытуемого материала прибавляют 25 мл предварительно нейтрализованной смеси равных объемов *этанола Р* и *эфира Р*, прибавляют 0,2 мл *раствора бромтимолового синего Р1* и взбалтывают. Окрашивание

раствора может измениться до синего при прибавлении не более 0,15 мл *0,01 М раствора натрия гидроксида.*

Вязкость (*2.2.10*). Динамическую вязкость определяют при температуре 25^{0}С. Кинематическую вязкость рассчитывают, используя относительную плотность, равную 0,97. Кинематическая вязкость должна быть не менее 95% и не более 105% от номинальной вязкости, обозначенной на этикетке.

Минеральные масла. 2 мл испытуемого материала помещают в пробирку и просматривают в УФ - свете при длине волны 365 нм. В тех же условиях флуоресценция должна быть не более интенсивной, чем флуоресценция раствора, содержащего 0,1 ppm *хинина сульфата Р* в *0,005 М растворе кислоты серной.*

Фенилированные компоненты. Показатель преломления (*2.2.6*) должен быть не более 1,410.

Тяжелые металлы. 1,0 г испытуемого материала смешивают с *метиленхлоридом Р* и доводят тем же растворителем до объема 20 мл. Прибавляют 1,0 мл свежеприготовленного раствора 0,02 г/л *дитизона Р* в *метиленхлориде Р*, 0,5 мл *эталонного раствора свинца (10 ppm) Р* и 0,5 мл смеси 1 объема *раствора аммиака разведенного Р2* и 9 объемов раствора 2 г/л *гидроксиламина гидрохлорида Р*.

Полученный раствор немедленно энергично встряхивают в течение 1 мин. Красное окрашивание испытуемого раствора не должно быть интенсивнее окрашивания эталонного раствора (5 ppm).

Летучие вещества. Не более 2,0 %. Определение проводят из 2,00 г испытуемого материала при нагревании в термостате при температуре 150^{0}С в течение 24 ч. Исследования проводят, используя чашку диаметром 60 мм и глубиной 10 мм.

МАРКИРОВКА

На этикетке помечают номинальную вязкость в виде числа, расположенного после названия продукта. На этикетке также помечают, что содержимое следует использовать в качестве смазывающей добавки.

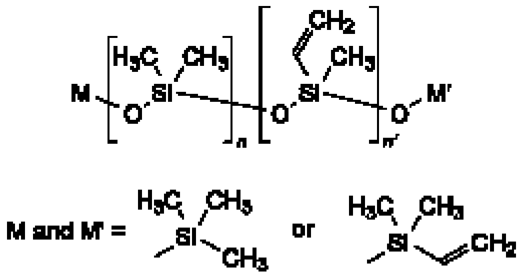
3.1.9. СИЛИКОНОВЫЕ ЭЛАСТОМЕРЫ ДЛЯ УКУПОРОЧНЫХ СРЕДСТВ И ТРУБОК

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Для изготовления укупорочных средств и трубок подходит силиконовый эластомер, отвечающий следующим требованиям.

Силиконовый эластомер получают поперечным сшиванием линейного полисилоксана, который состоит, в основном, из диметилсилокси-частей с небольшими количествами метилвинилсилокси-групп; концы цепей блокированы триметилсилокси- или диметилвинилсилокси-группами.

Общая формула полисилоксана:



Поперечное сшивание происходит в горячем состоянии или с использованием:

- 2,4-дихлорбензоилпероксида для экструдированных продуктов,
- 2,4-дихлорбензоилпероксида или дикумилпероксида, или *OO*-(1,1-диметилэтил) *O*-изопропил монопероксикарбоната, или 2,5 –бис[(1,1-диметилэтил)диокси]-2,5-диметилгексана для формованных продуктов,

или

- гидроксилированием-SiH групп полисилоксана, используя в качестве катализатора платину.

Во всех случаях используют соответствующие добавки, такие, как кремния диоксид, и иногда небольшое количество органосиликоновых добавок (α,ω-дигидроксиполидиметилсилоксан).

ОПИСАНИЕ

Прозрачный или полупрозрачный материал, практически нерастворимый в органических растворителях, некоторые из них, например, циклогексан, гексан и метиленхлорид, вызывают обратимое набухание материала.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ

А. Испытание проводят методом инфракрасной абсорбционной спектрометрии (*2.2.24*). Инфракрасный спектр испытуемого материала, записанный с помощью методики многократного отражения для твердых веществ, должен соответствовать спектру *силиконового эластомера ФСО.*

В. 1,0 г испытуемого материала помещают в пробирку и нагревают над небольшим огнем до появления белых паров. Пробирку переворачивают над другой пробиркой, которая содержит 1 мл раствора 1 г/л *хромотроповой кислоты натриевой соли Р* в *кислоте серной Р*, таким образом, чтобы пар достиг раствор. Другую пробирку встряхивают в течение около 10 с и нагревают на водяной бане в течение 5 мин. Раствор становится фиолетовым.

D. 50 мг остатка после сжигания дают реакцию на силикаты (*2.3.1*).

ИСПЫТАНИЯ

Если необходимо, образцы испытуемого материала разрезают на части с максимальной длиной стороны не более 1 см.

Раствор S. 25 г испытуемого материала помещают в коническую колбу из боросиликатного стекла с притертой пробкой. Прибавляют 500 мл *воды Р* и кипятят с обратным холодильником в течение 5 ч. Охлаждают и декантируют раствор.

Внешний вид раствора. Раствор S должен быть прозрачным (*2.2.1*).

Кислотность или щелочность. К 100 мл раствора S прибавляют 0,15 мл *раствора бромтимолового синего Р1*. Для изменения окраски раствора на синюю должно потребоваться не более 2,5 мл *0,01 М раствора натрия гидроксида*. К 100 мл раствора S прибавляют 0,2 мл *раствора метилового оранжевого Р*. Для изменения окраски раствора на желтую или оранжевую должно потребоваться не более 1,0 мл *0,01 М раствора кислоты хлористоводородной.*

Относительная плотность (*2.2.5*). От 1,05 до 1,25. Испытание проводят, используя вискозиметр с *этанолом Р* в качестве иммерсионной жидкости.

Восстановители. К 20,0 мл раствора S прибавляют 1 мл *кислоты серной разведенной Р* и 20,0 мл *0,002 М раствора калия перманганата*. Оставляют смесь на 15 мин. Прибавляют 1 г *калия иодида Р* и сразу титруют *0,01 М раствором натрия тиосульфата*, используя в качестве индикатора 0,25 мл *раствора крахмала Р*. Параллельно проводят контрольный опыт с использованием 20 мл *воды Р* вместо раствора S. Разность между объемами титранта не должна превышать 1,0 мл.

Вещества, растворимые в гексане. 25 мл раствора, полученного при испытании «Фенилированные компоненты», выпаривают в стеклянной выпарительной чашке на водяной бане и высушивают в сушильном шкафу при температуре от 100^0C до 105^0C в течение 1 ч. Масса полученного остатка не должна превышать 15 мг (3%).

Фенилированные компоненты. 2,0 г испытуемого материала помещают в колбу из боросиликатного стекла с притертой пробкой и прибавляют 100 мл *гексана Р*. Кипятят с обратным холодильником в течение 4 ч. Охлаждают, потом быстро фильтруют через стеклянный фильтр (16) в колбу с притертой пробкой. Полученный фильтрат плотно закрывают для предотвращения испарения. Оптическая плотность (*2.2.25*) в области от 250 нм до 340 нм не должна превышать 0,4.

Минеральные масла. 2 мл испытуемого материала помещают в коническую колбу вместимостью 100 мл, содержащую 30 мл смеси, состоящей из 5 объемов *аммиака Р* и 95 объемов *пиридина Р*. Смесь оставляют на 2 ч, периодически перемешивая. Полученный раствор пиридина декантируют и просматривают в УФ - свете при длине волны 365 нм. В тех же условиях флуоресценция должна быть не более интенсивной, чем флуоресценция раствора, содержащего 1 ppm *хинина сульфата Р* в *0,005 М растворе кислоты серной.*

Летучие вещества. Взвешивают 10,0 г испытуемого материала, предварительно выдержанного в эксикаторе в течение 48 ч над *кальция хлоридом безводным Р*, нагревают в термостате при температуре 200^0C в течение 4 ч, охлаждают в эксикаторе и снова взвешивают. Для силиконового эластомера, изготовленного с использованием пероксидов, содержание летучих веществ не должно превышать 0,5%. Для силиконового эластомера, изготовленного с использованием платины, содержание летучих веществ не должно превышать 2,0%.

Силиконовый эластомер, изготовленный с использованием пероксидов, должен выдерживать следующее дополнительное испытание:

Остаточные пероксиды. 5 г испытуемого материала помещают в колбу из боросиликатного стекла, прибавляют 150 мл *метиленхлорида Р*, закрывают колбу и перемешивают при помощи механической мешалки в течение 16 ч. Затем быстро фильтруют, собирая фильтрат в колбу с притертой пробкой. Замещают воздух в колбе на *азот, свободный от кислорода Р*, прибавляют 1 мл раствора 200 г/л *натрия иодида Р* в *кислоте уксусной безводной Р*, закрывают колбу, тщательно встряхивают и помещают в защищенное от света место на 30 мин. Прибавляют 50 мл *воды Р* и немедленно титруют *0,01 М раствором натрия тиосульфата*, используя в качестве индикатора 0,25 мл *раствора крахмала Р*. Параллельно проводят контрольный опыт. Разность между объемами титранта не должна превышать 2,0 мл (0,08% в пересчете на дихлорбензоила пероксид).

Силиконовый эластомер, изготовленный с использованием платины, должен выдерживать следующее дополнительное испытание:

Платина. 1,0 г испытуемого материала сжигают в кварцевом тигле, постепенно поднимая температуру, до получения белого остатка. Остаток переносят в графитовый тигель. В кварцевый тигель прибавляют 10 мл свежеприготовленной смеси 1 объема *кислоты азотной Р* и 3 объемов *кислоты хлористоводородной Р*, нагревают на водяной бане в течение 1-2 мин и переносят в графитовый тигель. Прибавляют 5 мг *калия хлорида Р* и 5 мл *кислоты фтористоводородной Р* и выпаривают досуха на водяной бане. Прибавляют 5 мл *кислоты фтористоводородной Р* и снова выпаривают досуха; повторяют эту операцию дважды. Полученный остаток растворяют в 5 мл *1 М раствора кислоты хлористоводородной* при нагревании на водяной бане и охлаждают. Полученный раствор прибавляют к 1 мл раствора 250 г/л *олова (II) хлорида Р* в *1 М растворе кислоты хлористоводородной*, промывают графитовый тигель несколькими миллилитрами *1 М раствора кислоты хлористоводородной*, присоединяя их к тому же раствору, и доводят объем раствора той же кислотой до 10,0 мл. Параллельно готовят эталонный раствор: к 1 мл раствора 250 г/л *олова (II) хлорида Р* в *1 М растворе кислоты хлористоводородной* прибавляют 1,0 мл *эталонного раствора платины (30 ppm Pt) Р* и доводят объем раствора *1 М раствором кислоты хлористоводородной* до 10,0 мл. Окрашивание испытуемого раствора должно быть не более интенсивным, чем окрашивание эталонного раствора (30 ppm).

МАРКИРОВКА

На этикетке помечают, что материал изготовлен с использованием пероксидов или платины.

3.1.10. МАТЕРИАЛЫ НА ОСНОВЕ НЕПЛАСТИФИЦИРОВАННОГО ПОЛИВИНИЛХЛОРИДА ДЛЯ КОНТЕЙНЕРОВ ДЛЯ НЕИНЪЕКЦИОННЫХ ВОДНЫХ РАСТВОРОВ

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Материалы на основе непластифицированного поливинилхлорида, отвечающие требованиям указанных ниже спецификаций, используют для изготовления

контейнеров для неинъекционных водных растворов. Они также могут быть использованы для твердых лекарственных форм для перорального применения. В некоторых случаях, когда проведены специальные исследования на совместимость контейнера и его содержимого, эти материалы могут быть подходящими для изготовления контейнеров для суппозиториев. Они состоят из одного или более поливинилхлорида/винилацетата или смеси поливинилхлорида и поливинилацетата или поливинилхлорида.

Они содержат не более 1 ppm винилхлорида.

Содержание поливинилхлорида, рассчитанное по содержания хлора, не менее 80%.

Они могут содержать не более 15% сополимеров на основе акриловой и/или метакриловой кислот и/или их эфиров, и/или на основе стирола и/или бутадиена.

ПРОИЗВОДСТВО

Материалы на основе непластифицированного поливинилхлорида получают методами полимеризации, которые гарантируют остаточное содержание винилхлорида менее 1 ppm. Данный метод получения может быть валидирован для доведения соответствия продукта требованиям следующего испытания:

Винилхлорид. Не более 1 ppm. Определение проводят методом парофазной газовой хроматографии *(2.2.28)*, используя в качестве внутреннего стандарта *эфир Р.*

Раствор внутреннего стандарта. К 20,0 мл *диметилацетамида Р* с помощью микрошприца добавляют 10 мкл *эфира Р*, погружая конец иглы в растворитель. Непосредственно перед использованием разбавляют раствор *диметилацетамидом Р* в 1000 раз.

Испытуемый раствор. Во флакон вместимостью 50 мл помещают 1,000 г испытуемого материала и прибавляют 10,0 мл раствора внутреннего стандарта. Герметично закрывают колбу пробкой. Встряхивают, избегая контакта жидкости с пробкой. Помещают флакон на водяную баню при температуре (60±1)^{0}С и выдерживают в течение 2 ч.

Основной раствор винилхлорида. Готовят в вытяжном шкафу. Во флакон вместимостью 50 мл помещают 50,0 мл *диметилацетамида Р*, герметично закрывают пробкой и взвешивают с точностью до 0,1 мг. Наполняют полиэтиленовый или полипропиленовый шприц вместимостью 50 мл газообразным *винилхлоридом Р*, оставляют шприц в контакте с газом в течение 3 мин, затем газ удаляют и снова наполняют шприц 50,0 мл газообразного *винилхлорида Р.* Подбирают для шприца гиподермальную иглу и уменьшают объем раствора в шприце до 25 мл. Медленно вводят оставшиеся 25 мл винилхлорида во флакон, осторожно встряхивая и избегая контакта жидкости с иглой. Опять взвешивают флакон. Увеличение массы должно составлять около 60 мг (1 мкл раствора содержит около 1,2 мкг винилхлорида). Оставляют на 2 ч. Затем хранят основной раствор в холодильнике.

Стандартный раствор винилхлорида. К 1 объему основного раствора винилхлорида прибавляют 3 объема *диметилацетамида Р*.

Растворы сравнения. В 6 одинаковых флаконов вместимостью 50 мл помещают по 10,0 мл раствора внутреннего стандарта. Флаконы герметично закрывают пробками. В 5 флаконов прибавляют соответственно 1 мкл, 2 мкл, 3 мкл, 5 мкл и 10 мкл стандартного раствора винилхлорида. Полученные таким образом 6 растворов содержат соответственно 0 мкг, около 0,3 мкг, 0,6 мкг, 0,9 мкг, 1,5 мкг и 3 мкг винилхлорида. Встряхивают, избегая контакта жидкости с пробкой. Помещают колбы на водяную баню при температуре (60±1)^{0}С и выдерживают в течение 2 ч.

Условия хроматографирования:

- колонка из нержавеющей стали длиной 3 м, с внутренним диаметром 3 мм, заполненная сорбентом *диатомит силанизированный для газовой хроматографии Р,* импрегнированным 5 % *(м/м) диметилстеариламида Р* и 5 % *(м/м) макроголя 400 Р*;
- газ–носитель – *азот для хроматографии Р*; скорость газа–носителя – 30 мл/мин;
- детектор пламенно-ионизационный;
- температура колонки – 45^{0}С;
- температура блока ввода проб – 100^{0}С;
- температура детектора – 150^{0}С.

Хроматографируют по 1 мл паровой фазы из каждого флакона. Рассчитывают содержание винилхлорида.

Для получения необходимых механических характеристик и характеристик стабильности материал на основе непластифицированного поливинилхлорида может содержать:

- не более 8% эпоксидированного соевого масла с содержанием кислорода в эпоксидной группе от 6% до 8% и йодным числом не более 6%,
- не более 1,5% кальциевых или цинковых солей алифатических жирных кислот, содержащих не более семи атомов углерода, или не более 1,5% суммы этих веществ,
- не более 1,5% вазелинового масла,
- не более 1,5% восков,
- не более 2% гидрогенизированных масел или эфиров алифатических жирных кислот,
- не более 1,5% эфиров макроголя,
- не более 1,5% сорбита,
- не более 1% 2,4-динонилфенилфосфита или ди(4-нонилфенил)фосфита или трис(нонилфенил)фосфита.

Материалы на основе непластифицированного поливининилхлорида могут содержать стабилизаторы одной из следующих групп:

- не более 0,25% олова в виде ди(изооктил) 2,2'-[(диоктилстаннилен)бис(тио)]диацетата, содержащего около 27% три(изооктил)2,2',2''-[(монооктилстаннилидин)трис(тио)]триацетата,
- не более 0,25% олова в виде смеси, содержащей не более 76% ди(изооктил)2,2'-[(диметилстаннилен)бис(тио)]диацетата и не более 85%

три(изооктил)2,2',2''-[(монометилстаннилидин)трис(тио)]триацетата; (изооктил – например,2-этилгексил),

- не более 1% 1-фенилейкозан-1,3-диона(бензоилстеароилметана) или 2-(4-додецилфенил)индола или дидодецил 1,4-дигидропиридина-2,6-диметил-3,5-дикарбоксилата или 1% смеси обоих веществ.

Материалы на основе непластифицированного поливининилхлорида могут содержать краситель или пигмент и содержать добавку титана диоксида для обеспечения непрозрачности материала.

Поставщик материала несет ответственность за то, чтобы качественный и количественный состав типового образца соответствовал качественному и количественному составу каждой произведенной серии.

ОПИСАНИЕ

Порошок, шарики, гранулы, пластинки разной толщины или образцы, отобранные из готовых объектов, нерастворимые в воде и этаноле, растворимые в тетрагидрофуране, мало растворимые в метиленхлориде. При сжигании пламя окрашивается в оранжево-желтый цвет с зеленой каймой с выделением густого черного дыма.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ

Остаток А, полученный при приготовлении раствора S2, как обозначено в разделе «Испытания», растворяют в 5 мл *тетрагидрофурана Р*. Несколько капель полученного раствора помещают на диск натрия хлорида и выпаривают растворитель досуха в сушильном шкафу при температуре от 100^{0}С до 105^{0}С. Испытание проводят методом инфракрасной абсорбционной спектрометрии (*2.2.24*). Инфракрасный спектр испытуемого материала должен иметь максимумы при следующих волновых числах: 2975 см$^{-1}$, 2910 см$^{-1}$, 2865 см$^{-1}$, 1430 см$^{-1}$, 1330 см$^{-1}$, 1255 см$^{-1}$, 690 см$^{-1}$и 615 см$^{-1}$. Полученный спектр должен соответствовать спектру типового образца.

ИСПЫТАНИЯ

Если необходимо, образцы испытуемого материала разрезают на части с максимальной длиной стороны не более 1 см.

Раствор S1. 25 г испытуемого материала помещают в колбу из боросиликатного стекла. Прибавляют 500 мл *воды Р* и закрывают горло колбы алюминиевой фольгой или лабораторным стаканом из боросиликатного стекла. Нагревают полученную смесь в автоклаве при температуре (121±2)^{0}С в течение 20 мин, после чего охлаждают и осаждают твердую фазу.

Раствор S2. 5,0 г испытуемого материала растворяют в 80 мл *тетрагидрофурана Р* и доводят объем раствора тем же самым растворителем до 100 мл. Если необходимо, фильтруют (раствор может иметь опалесценцию). 20 мл полученного раствора разбавляют 70 мл *спирта Р*, прибавляя его по каплям при легком перемешивании. Охлаждают на ледяной бане в течение 1 ч. Потом фильтруют или центрифугируют (остаток А). Остаток А промывают *спиртом Р*, прибавляют

его к фильтрату или надосадочной жидкости и доводят *спиртом Р* до объема 100 мл.

Раствор S3. 5 г испытуемого материала помещают в колбу из боросиликатного стекла с притертой пробкой. Прибавляют 100 мл *0,1 М раствора кислоты хлористоводородной* и кипятят с обратным холодильником в течение 1 ч. Потом охлаждают и осаждают твердую фазу.

Внешний вид раствора S1. Раствор S1 может иметь опалесценцию не более чем суспензия сравнения II (*2.2.1*) и должен быть бесцветным (*2.2.2, Метод II*).

Оптическая плотность раствора S1 (*2.2.25*). 100 мл раствора S1 выпаривают досуха. Остаток растворяют в 5 мл *гексана Р*. Если необходимо, фильтруют через фильтр, предварительно промытый *гексаном Р*. Оптическая плотность полученного раствора в области от 250 нм до 310 нм не должна превышать 0,25.

Оптическая плотность раствора S2 (*2.2.25*). Оптическая плотность раствора S2 в области от 250 нм до 330 нм не должна превышать 0,2 для материалов, стабилизированных оловом, или 0,4 – для других материалов.

Экстрагируемый барий. Определение проводят методом атомно-эмиссионной спектрометрии в среде аргона (*2.2.22, Метод I*).

Испытуемый раствор. Используют раствор S3.

Раствор сравнения. Раствор, содержащий 0,1 ppm бария, готовят разбавлением *эталонного раствора бария (50 ppm Ва) Р 0,1 М раствором кислоты хлористоводородной*.

Измеряют интенсивность светоиспускания бария при длине волны 455,40 нм, регулируя спектральный фон на уровне 455,30 нм.

Проверяют отсутствие бария в используемой кислоте хлористоводородной.

Интенсивность светоиспускания испытуемого материала при длине волны 455,40 нм не должна превышать интенсивность испускания раствора сравнения (2 ppm).

Экстрагируемый кадмий. Определение проводят методом атомно-абсорбционной спектрометрии (*2.2.23, Метод I*).

Испытуемый раствор. Используют раствор S3.

Раствор сравнения. Раствор, содержащий 0,03 ppm кадмия, готовят разбавлением *эталонного раствора кадмия (0,1% Cd) Р 0,1 М раствором кислоты хлористоводородной*.

Проверяют отсутствие кадмия в используемой кислоте хлористоводородной.

Оптическая плотность испытуемого раствора при длине волны 228,8 нм не должна превышать оптическую плотность раствора сравнения (0,6 ppm).

Материалы, стабилизированные оловом. К 0,10 мл раствора S2 в пробирке прибавляют 0,05 мл *1 М раствора кислоты хлористоводородной*, 0,5 мл раствора *калия йодида Р* и 5 мл *спирта Р*, тщательно перемешивают и оставляют на 5 мин. К полученному раствору прибавляют 9 мл *воды Р* и 0,1 мл раствора 5 г/л *натрия сульфита Р* и тщательно перемешивают. Прибавляют 1,5 мл раствора *дитизона Р*, свежеразбавленного в 100 раз *метиленхлоридом Р*, встряхивают в течение 15 с и оставляют на 2 мин. Параллельно готовят раствор сравнения, используя 0,1 мл стандартного раствора олова.

Любое фиолетовое окрашивание полученного нижнего слоя раствора S2 должно быть не более интенсивным, чем окрашивание раствора сравнения (0,25% Sn). Зеленовато-синее окрашивание раствора дитизона в присутствии олова переходит в розовое.

Основной раствор олова. 81 мг *добавки к пластмассе 23 ФСО* растворяют в мерной колбе вместимостью 100 мл и доводят объем раствора *тетрагидрофураном Р* до 100 мл.

Стандартный раствор олова. 20 мл основного раствора олова доводят *спиртом Р* в мерной колбе вместимостью 100 мл до метки.

Материалы, нестабилизированные оловом. К 5 мл раствора S2 в пробирке прибавляют 0,05 мл *1 М раствора кислоты хлористоводородной* и 0,5 мл раствора *калия йодида Р*. Тщательно перемешивают и оставляют на 5 мин. К полученному раствору прибавляют 9 мл *воды Р* и 0,1 мл раствора 5 г/л *натрия сульфита Р* и тщательно перемешивают. Если полученный раствор не окрашен, прибавляют раствор натрия сульфита порциями по 0,05 мл. Прибавляют 1,5 мл раствора *дитизона Р*, свежеразбавленного в 100 раз *метиленхлоридом Р*, встряхивают в течение 15 с и оставляют на 2 мин. Параллельно готовят раствор сравнения, используя 0,05 мл стандартного раствора олова.

Любое фиолетовое окрашивание полученного нижнего слоя раствора S2 должно быть не более интенсивным, чем окрашивание раствора сравнения (25 ppm Sn).

Экстрагируемые тяжелые металлы (*2.4.8*). 12 мл раствора S3 выдерживают требования испытания А на тяжелые металлы (20 ppm). Эталонный раствор готовят с использованием 10 мл *эталонного раствора свинца (1 ppm Pb) Р*.

Экстрагируемый цинк. Определение проводят методом атомно-абсорбционной спектрометрии *(2.2.23, Метод I)*.

Испытуемый раствор. Раствор S3 разбавляют *водой Р* в 10 раз.

Раствор сравнения. Раствор, содержащий 0,50 ppm цинка, готовят разбавлением *эталонного раствора цинка (5 мг/мл Zn) Р 0,01 М раствором кислоты хлористоводородной*.

Проверяют отсутствие цинка в используемой кислоте хлористоводородной.

Оптическая плотность испытуемого раствора при длине волны 214,0 нм не должна превышать оптическую плотность раствора сравнения (100 ppm).

Сульфатная зола (*2.4.14*). Не более 1,0%. Определение проводят из 1,0 г испытуемого материала. Для материалов, содержащих титана диоксид как добавку, придающую непрозрачность, содержание сульфатной золы не должно превышать 4,0%.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Определение проводят методом сжигания в колбе с кислородом (*2.5.10*), используя 50,0 мг испытуемого материала. Продукты сжигания растворяют в 20 мл *1 М раствора натрия гидроксида*. К полученному раствору прибавляют 2,5 мл *кислоты азотной Р*, 10,0 мл *0,1 М раствора серебра нитрата*, 5 мл *раствора железа (III) аммония сульфата Р2*, 1 мл *дибутилфталата Р*. Титруют *0,05 М раствором аммония тиоцианата* до появления красновато-желтого окрашивания. Параллельно проводят контрольный опыт.

1 мл *0,1 М раствора серебра нитрата* соответствует 6,25 мг поливинилхлорида.

3.1.11. МАТЕРИАЛЫ НА ОСНОВЕ НЕПЛАСТИФИЦИРОВАННОГО ПОЛИВИНИЛХЛОРИДА ДЛЯ КОНТЕЙНЕРОВ ДЛЯ ТВЕРДЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ ДЛЯ ПЕРОРАЛЬНОГО ПРИМЕНЕНИЯ

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Материалы на основе непластифицированного поливинилхлорида для контейнеров для твердых лекарственных форм для перорального применения используют для изготовления пластинок или контейнеров.

Состоят из одного или более поливинилхлорида/поливинилацетата или смеси поливинилхлорида и поливинилацетата или поливинилхлорида.

Содержат не более 1 ppm винилхлорида.

Содержание поливинилхлорида, рассчитанное по содержанию хлора, не менее 80%.

Могут содержать не более 15% сополимеров на основе акриловой и/или метакриловой кислот и/или их эфиров, и/или на основе стирола и/или бутадиена.

ПРОИЗВОДСТВО

Материалы на основе непластифицированного поливинилхлорида получают методами полимеризации, которые гарантируют остаточное содержание винилхлорида менее 1 ppm. Данный метод получения может быть валидирован для доведения соответствия продукта требованиям следующего испытания.

Винилхлорид. Не более 1 ppm. Определение проводят методом парофазной газовой хроматографии *(2.2.28)*, используя в качестве внутреннего стандарта *эфир Р.*

Раствор внутреннего стандарта. К 20,0 мл *диметилацетамида Р* с помощью микрошприца добавляют 10 мкл *эфира Р*, погружая конец иглы в растворитель. Непосредственно перед использованием разбавляют раствор *диметилацетамидом Р* в 1000 раз.

Испытуемый раствор. Во флакон вместимостью 50 мл помещают 1,000 г испытуемого материала и прибавляют 10,0 мл раствора внутреннего стандарта. Герметично закрывают флакон пробкой. Встряхивают, избегая контакта жидкости с пробкой. Помещают флакон на водяную баню при температуре (60±1)^{0}С и выдерживают в течение 2 ч.

Основной раствор винилхлорида. Готовят в вытяжном шкафу. Во флакон вместимостью 50 мл помещают 50,0 мл *диметилацетамида Р*, герметично закрывают пробкой и взвешивают с точностью до 0,1 мг. Наполняют полиэтиленовый или полипропиленовый шприц вместимостью 50 мл газообразным *винилхлоридом Р*, оставляют шприц в контакте с газом в течение 3 мин, затем газ удаляют и снова наполняют шприц 50,0 мл газообразного *винилхлорида Р*. Подбирают для шприца гиподермальную иглу и уменьшают объем раствора в шприце до 25 мл. Медленно вводят оставшиеся 25 мл винилхлорида во флакон, осторожно встряхивая и избегая контакта жидкости с иглой. Опять взвешивают флакон. Увеличение массы должно составлять около 60 мг (1 мкл раствора содержит около 1,2 мкг винилхлорида). Оставляют на 2 ч. Хранят основной раствор в холодильнике.

Стандартный раствор винилхлорида. К 1 объему основного раствора винилхлорида прибавляют 3 объема *диметилацетамида Р*.

Растворы сравнения. В 6 одинаковых флаконов вместимостью 50 мл помещают по 10,0 мл раствора внутреннего стандарта. Флаконы герметично закрывают пробками. В 5 флаконов прибавляют соответственно 1 мкл, 2 мкл, 3 мкл, 5 мкл и 10 мкл стандартного раствора винилхлорида. Полученные таким образом 6 растворов содержат соответственно 0 мкг, около 0,3 мкг, 0,6 мкг, 0,9 мкг, 1,5 мкг и 3 мкг винилхлорида. Встряхивают, избегая контакта жидкости с пробкой. Помещают флаконы на водяную баню при температуре (60±1)^{0}С и выдерживают в течение 2 ч.

Условия хроматографирования:

- колонка из нержавеющей стали длиной 3 м, с внутренним диаметром 3 мм, заполненная сорбентом *диатомит силанизированный для газовой хроматографии Р,* импрегнированным 5 % *(м/м) диметилстеариламида Р* и 5 % *(м/м) макроголя 400 Р*;
- газ–носитель – *азот для хроматографии Р*; скорость газа–носителя – 30 мл/мин;
- детектор пламенно-ионизационный;
- температура колонки – 45^{0}С;
- температура блока ввода проб – 100^{0}С;
- температура детектора – 150^{0}С.

Хроматографируют по 1 мл паровой фазы из каждого флакона. Рассчитывают содержание винилхлорида.

Добавки

Для получения необходимых механических характеристик и характеристик стабильности материал на основе непластифицированного поливинилхлорида может содержать:

- не более 2% эпоксидированного соевого масла с содержанием кислорода в эпоксидной группе от 6% до 8% и йодным числом не более 6% для материалов, стабилизированных оловом,
- не более 3% эпоксидированного соевого масла с содержанием кислорода в эпоксидной группе от 6% до 8% и йодным числом не более 6% для материалов, нестабилизированных оловом,
- не более 1,5% кальциевых или цинковых солей алифатических жирных кислот, содержащих не более семи атомов углерода, или не более 1,5% смеси этих веществ,
- не более 4% восков,
- не более 1,5% вазелинового масла,
- не более 2% гидрогенизированных масел или эфиров алифатических жирных кислот,
- не более 4% суммарного содержания трех приведенных выше смазывающих добавок,
- не более 1,5% эфиров макроголя,
- не более 1,5% сорбита,
- не более 1% 2,4-динонилфенилфосфита или ди(4-нонилфенил)фосфита или трис(нонилфенил)фосфита,
- не более 1% кальция карбоната,
- не более 1% кремния диоксида.

Материалы на основе непластифицированного поливининилхлорида могут содержать стабилизаторы одной из следующих групп:

- не более 0,25% олова в виде ди(изооктил) 2,2'-[(диоктилстаннилен)бис(тио)]диацетата, содержащего около 27% три(изооктил)2,2',2''-[(монооктилстаннилидин)трис(тио)]триацетата,
- не более 0,25% олова в виде смеси, содержащей не более 76% ди(изооктил)2,2'-[(диметилстаннилен)бис(тио)]диацетата и не более 85% три(изооктил)2,2',2''-[(монометилстаннилидин)трис(тио)]триацетата; (изооктил – например,2-этилгексил),
- не более 1% 1-фенилейкозан-1,3-диона(бензоилстеароилметана).

Материалы на основе непластифицированного поливининилхлорида могут содержать краситель или пигмент и добавку титана диоксида для обеспечения непрозрачности материала.

Поставщик материала несет ответственность за то, чтобы качественный и количественный состав типового образца соответствовал качественному и количественному составу каждой произведенной серии.

ОПИСАНИЕ

Порошок, шарики, гранулы, пластинки разной толщины или образцы, отобранные из готовых объектов, нерастворимые в воде и этаноле, растворимые в тетрагидрофуране, мало растворимые в метиленхлориде. При сжигании пламя окрашивается в оранжево-желтый цвет с зеленой каймой с выделением густого черного дыма.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ

Остаток А, полученный при приготовлении раствора S2, как обозначено в разделе «Испытания», растворяют в 5 мл *тетрагидрофурана Р*. Несколько капель полученного раствора помещают на диск натрия хлорида и выпаривают растворитель досуха в сушильном шкафу при температуре от 100^0C до 105^0C. Испытание проводят методом инфракрасной абсорбционной спектрофотометрии (*2.2.24*). Инфракрасный спектр испытуемого материала должен иметь максимумы при следующих волновых числах: 2975 $см^{-1}$, 2910 $см^{-1}$, 2865 $см^{-1}$, 1430 $см^{-1}$, 1330 $см^{-1}$, 1255 $см^{-1}$, 690 $см^{-1}$и 615 $см^{-1}$. Полученный спектр должен соответствовать спектру типового образца.

ИСПЫТАНИЯ

Если необходимо, образцы испытуемого материала разрезают на части с максимальной длиной стороны не более 1 см.

Раствор S1. 25 г испытуемого материала помещают в колбу из боросиликатного стекла. Прибавляют 500 мл *воды для Р* и закрывают горло колбы алюминиевой фольгой или лабораторным стаканом из боросиликатного стекла. Нагревают полученную смесь в автоклаве при температуре $(121\pm2)^0$C в течение 20 мин, после чего охлаждают и осаждают твердую фазу.

Раствор S2. 5,0 г испытуемого материала растворяют в 80 мл *тетрагидрофурана Р* и доводят объем раствора тем же растворителем до 100 мл. Если необходимо, фильтруют (раствор может иметь опалесценцию). 20 мл полученного раствора разбавляют 70 мл *спирта Р*, прибавляя его по каплям при легком перемешивании. Охлаждают на ледяной бане в течение 1 ч. Потом фильтруют или центрифугируют (остаток А). Остаток А промывают *спиртом Р*, прибавляют его к фильтрату или надосадочной жидкости и доводят *спиртом Р* до объема 100 мл.

Раствор S3. 5 г испытуемого материала помещают в колбу из боросиликатного стекла с притертой пробкой. Прибавляют 100 мл *0,1 М раствора кислоты хлористоводородной* и кипятят с обратным холодильником в течение 1 ч. Потом охлаждают и осаждают твердую фазу.

Внешний вид раствора S1. Раствор S1 может иметь опалесценцию не более чем суспензия сравнения II (*2.2.1*) и должен быть бесцветным (*2.2.2, Метод II*).

Оптическая плотность раствора S1 (*2.2.25*). 100 мл раствора S1 выпаривают досуха. Остаток растворяют в 5 мл *гексана Р*. Если необходимо, фильтруют через фильтр, предварительно промытый *гексаном Р*. Оптическая плотность полученного раствора в области от 250 нм до 310 нм не должна превышать 0,25.

Оптическая плотность раствора S2 (*2.2.25*). Оптическая плотность раствора S2 для испытуемого материала, не содержащего 1-фенилейкозан-1,3-дион, в области от 250 нм до 330 нм не должна превышать 0,5. Для испытуемого материала, содержащего 1-фенилейкозан-1,3-дион, оптическая плотность раствора S2, разбавленного в 10 раз *спиртом Р*, в области от 250 нм до 330 нм, не должна превышать 0,4.

Материалы, стабилизированные оловом. К 0,10 мл раствора S2 в пробирке прибавляют 0,05 мл *1 М раствора кислоты хлористоводородной*, 0,5 мл раствора *калия йодида Р* и 5 мл *спирта Р*, тщательно перемешивают и оставляют на 5 мин. К полученному раствору прибавляют 9 мл *воды Р* и 0,1 мл раствора 5 г/л *натрия сульфита Р* и тщательно перемешивают. Прибавляют 1,5 мл раствора *дитизона Р*, свежеразбавленного в 100 раз *метиленхлоридом Р*, встряхивают в течение 15 с и оставляют на 2 мин. Параллельно готовят раствор сравнения, используя 0,1 мл стандартного раствора олова.

Любое фиолетовое окрашивание полученного нижнего слоя раствора S2 должно быть не более интенсивным, чем окрашивание раствора сравнения (0,25% Sn). Зеленовато-синее окрашивание раствора дитизона в присутствии олова переходит в розовое.

Основной раствор олова. 81 мг *добавки к пластмассе 23 ФСО* растворяют в мерной колбе вместимостью 100 мл и доводят объем раствора *тетрагидрофураном Р* до 100 мл.

Стандартный раствор олова. 20 мл основного раствора олова доводят *спиртом Р* в мерной колбе вместимостью 100 мл до метки.

Материалы, нестабилизированные оловом. К 5 мл раствора S2 в пробирке прибавляют 0,05 мл *1 М раствора кислоты хлористоводородной* и 0,5 мл раствора *калия йодида Р*. Тщательно перемешивают и оставляют на 5 мин. К полученному раствору прибавляют 9 мл *воды Р* и 0,1 мл раствора 5 г/л *натрия сульфита Р* и тщательно перемешивают. Если полученный раствор не окрашен, прибавляют раствор натрия сульфита порциями по 0,05 мл. Потом прибавляют 1,5 мл раствора *дитизона Р*, свежеразбавленного в 100 раз *метиленхлоридом Р*, смешивают в течение 15 с и оставляют на 2 мин. Параллельно готовят раствор сравнения, используя 0,05 мл стандартного раствора олова.

Любое фиолетовое окрашивание полученного нижнего слоя раствора S2 должно быть не более интенсивным, чем окрашивание раствора сравнения (25 ppm Sn).

Экстрагируемые тяжелые металлы *(2.4.8*). 12 мл раствора S3 выдерживают требования испытания А на тяжелые металлы (20 ppm). Эталонный раствор готовят с использованием 10 мл *эталонного раствора свинца (1 ppm Pb) Р*.

Экстрагируемый цинк. Определение проводят методом атомно-абсорбционной спектрометрии *(2.2.23, Метод I)*.

Испытуемый раствор. Раствор S3 разбавляют *водой Р* в 10 раз.

Раствор сравнения. Раствор, содержащий 0,50 ppm цинка, готовят разбавлением *эталонного раствора цинка (5 мг/мл Zn) Р 0,01 М раствором кислоты хлористоводородной*.

Проверяют отсутствие цинка в используемой кислоте хлористоводородной.

Оптическая плотность испытуемого раствора при длине волны 214,0 нм не должна превышать оптическую плотность раствора сравнения (100 ppm).

Сульфатная зола (*2.4.14*). Не более 1,0%. Определение проводят из 1,0 г испытуемого материала. Для материалов, содержащих титана диоксид как добавку, придающую непрозрачность, содержание сульфатной золы не должно превышать 4,0%.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ

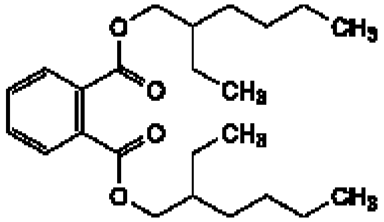
Определение проводят методом сжигания в колбе с кислородом (*2.5.10*), используя 50,0 мг испытуемого материала. Продукты сжигания растворяют в 20 мл *1 М раствора натрия гидроксида*. К полученному раствору прибавляют 2,5 мл *кислоты азотной Р*, 10,0 мл *0,1 М раствора серебра нитрата*, 5 мл *раствора железа (III) аммония сульфата Р2*, 1 мл *дибутилфталата Р*. Титруют *0,05 М раствором аммония тиоцианата* до появления красновато-желтого окрашивания. Параллельно проводят контрольный опыт.

1 мл *0,1 М раствора серебра нитрата* соответствует 6,25 мг поливинилхлорида.

3.1.13. ДОБАВКИ К ПЛАСТМАССЕ

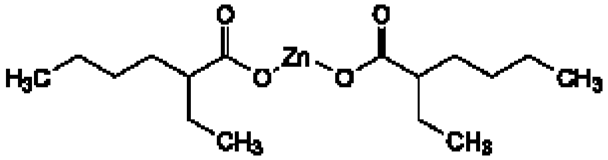
ПРИМЕЧАНИЕ: номенклатура обозначена соответственно правилам IUPAC. Синонимы, обозначенные жирным шрифтом, соответствуют названиям, данным в тексте Раздела 3. Даны также синонимы, соответствующие правилам текстов «Chemical Abstract».

Добавка 01. $C_{24}H_{38}O_4$. [117-81-7]. PM RN 74640.



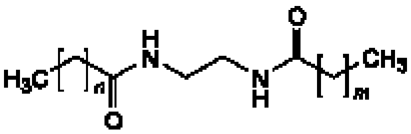
(2*RS*)-2-этилгексилбензол-1,2-дикарбоксилат
синонимы: - ди(2-этилгексил)фталат,
- 2,2-бензолдикарбоновой кислоты бис(2-этилгексил) эфир.

Добавка 02. $C_{16}H_{30}O_4Zn$. [136-53-8]. PM RN 54120.



цинк (2*RS*)-2-этилгексаноат
синонимы: - цинка октаноат,
- 2-этилгексановой кислоты цинковая соль (2:1),
- цинка 2-этилкапроат.

Добавка 03. [05518-18-3]/[00110-30-5]. PM RN 53440/53520.



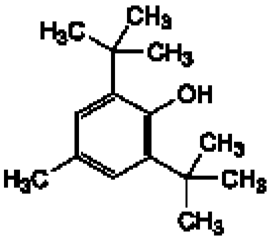
N,N'-этилендиалканамид (n и m = 14 или 16)
синонимы: - *N,N'*-диацилэтилендиамины,
- *N,N'*-диацилэтилендиамин (в данном контексте «ацил» означает, в частности, пальмитоил и стеароил).

Добавка 04. [8013-07-8]. PM RN 88640.
Эпоксидированное соевое масло.

Добавка 05. [8016-11-3]. PM RN 64240.
Эпоксидированное льняное масло.

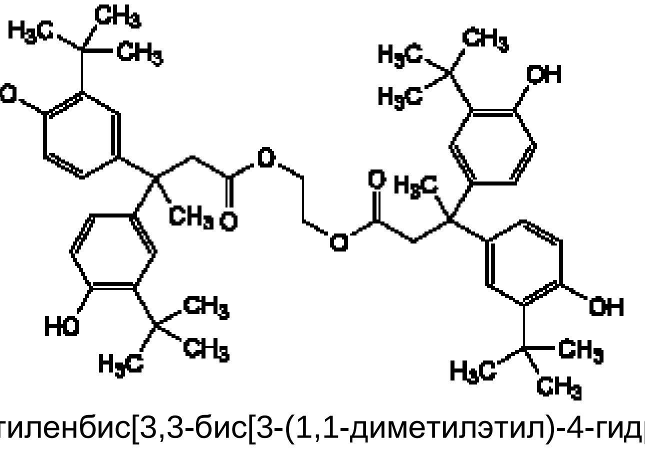
Добавка 06. [57455-37-5](TSCA)/[101357-30-6] (EINECS)/Pigment blue 29 (CI 77007).
Пигмент синий 29 (CI 77007).
Ультрамарин синий.

Добавка 07. $C_{15}H_{24}O$. [128-37-0] PM RN 46640.



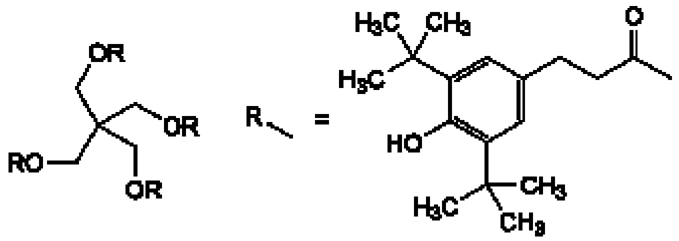
2,6-бис(1,1-диметилэтил)-4-метилфенол
синонимы: - бутилгидрокситолуол,
- 2,6-бис(1,1-диметилэтил)-4-метилфенол,
- 2,6-ди-*трет*-бутил-4-метилфенол.

Добавка 08. $C_{50}H_{66}O_8$. [32509-66-3]. PM RN 53670.



этиленбис[3,3-бис[3-(1,1-диметилэтил)-4-гидроксифенил]бутаноат]
синонимы: - этиленбис[3,3 бис[3-(1,1-диметилэтил)-4-гидрокси-фенил]бутаноат],
- 3,3-бис[3(1,1-диметилэтил)-4-гидроксифенил]бутановой кислоты 1,2-этандиоловый эфир,
- этиленбис[3,3-бис(3-*трет*-бутил-4-гидроксифенил)бутират].

Добавка 09. $C_{73}H_{108}O_{12}$. [6683-19-8]. PM RN 71680.

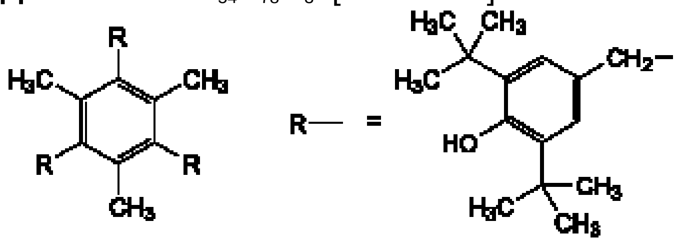


метантетрилтетраметилтетракис[3-[3,5-бис(1,1-диметилэтил)-4-гидроксифенил] пропаноат]

синонимы: - пентаэритритилтетракис[3-(3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидроксифенил) пропионат],

- 2,2-бис[[[3-[,5 бис(1,1-диметилэтил)-4-гидроксифенил]пропаноил] окси]метил]пропан-1,3-диил 3-[3,5-бис(1,1-диметилэтил)-4-гидрокси фенил] пропаноат,
- бензолпропановой кислоты 3,5-бис(1,1-диметилэтил)-4-гидрокси-2,2-бис(гидроксиметил)пропан-1,3-диола эфир (4:1),
- 2,2-бис(гидроксиметил)пропан-1,3-диолтетракис[3-(3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидроксифенил)пропионат].

Добавка 10. $C_{54}H_{78}O_3$. [1709-70-2]. PM RN 95200.

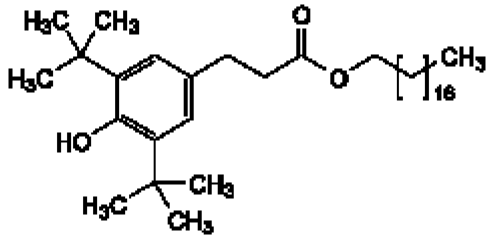


4,4′,4″-[(2,4,6-триметилбензол-1,3,5-триил)трис(метилен)]трис[2,6-бис(1,1-диметилэтил)фенол]

синонимы: - 2,2′,2″,6,6′,6″-гекса-*трет*-бутил-4,4′,4″-[(2,4,6-триметил-1,3,5-бензолтриил)трисметилен]трифенол,

- 1,3,5-трис[3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидроксибензил]-2,4,6-триметил бензол,
- 4,4′,4″-[(2,4,6-триметил-1,3,5-бензолтриил)трис(метилен)]трис[2,6-бис(1,1-диметилэтил)фенола.

Добавка 11. $C_{35}H_{62}O_3$. [2082-79-3]. PM RN 68320.

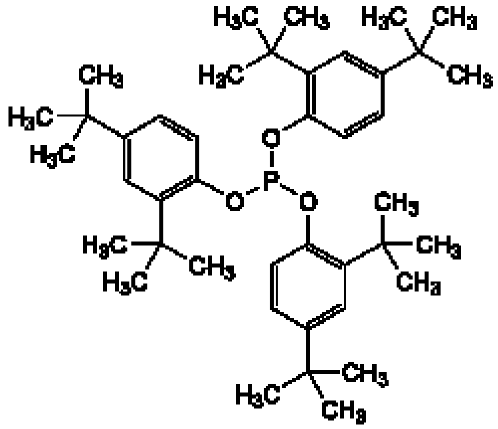


октадецил 3-[3,5-бис(1,1-диметилэтил)-4-гидроксифенил]пропаноат

синонимы: - октадецил 3-(3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидроксифенил)пропионат,

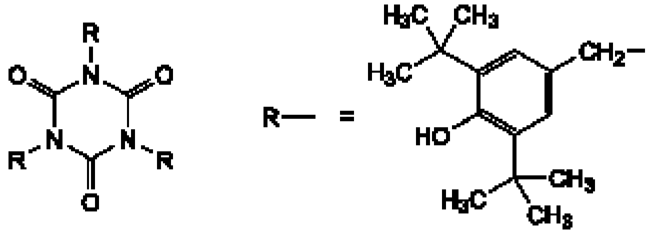
- 3-[3,5-бис(1,1-диметилэтил)-4-гидроксифенил]пропановой кислоты октадециловый эфир.

Добавка 12. $C_{42}H_{63}O_3P$. [31570-04-4]. PM RN 74240.



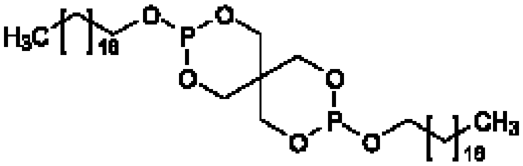
трис[2,4-бис(1,1-диметилэтил)фенил]фосфит
синонимы: - трис(2,4-ди-*трет*-бутилфенил)фосфит,
- 2,4-бис(1,1-диметилэтил)фенола фосфит (3:1),
- 2,4-бис(1,1-диметилэтил)фенил, фосфит.

Добавка 13. $C_{48}H_{69}N_3O_6$. [27676-62-6]. PM RN 95360.



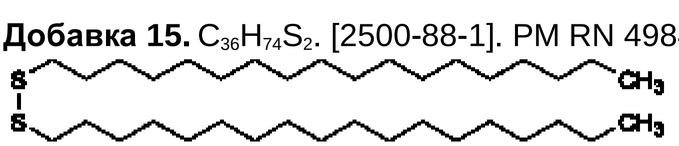
1,3,5-трис[3,5-бис(1,1-диметилэтил)-4-гидроксибензил]-1,3,5-триазин-2,4,6(1*H*,3*H*,5*H*)-трион
синонимы: - 1,3,5-трис(3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидроксибензил)-s-триазин-2,4,6 (1*H*,3*H*,5*H*)-трион,
-1,3,5-триазин-2,4,6(1*H*,3*H*,5*H*)-трион,1,3,5-трис[[3,5-бис(1,1-диметилэтил)-4-гидроксифенил]метил]-.

Добавка 14. $C_{41}H_{82}O_6P_2$. [3806-34-6]. PM RN 50080.



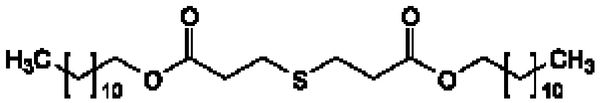
3,9-бис(октадецилокси)-2,4,8,10-тетраокса-3,9-дифосфаспиро[5.5]ундекан
синонимы: - 2,2'-бис(октадецилокси)-5,5-спироби[1,3,2-диоксафосфинан],
- 2.4.8.10-тетраокса-3,9-дифосфаспиро[5.5]ундекан,3,9-бис (октадецилокси)-.

Добавка 15. $C_{36}H_{74}S_2$. [2500-88-1]. PM RN 49840.



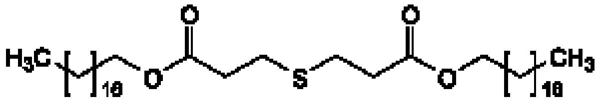
1,1'-дисульфандиилдиоктадекан
синонимы: - диоктадецилдисульфид,
- 1,1'-дитио-октадекан.

Добавка 16. $C_{30}H_{58}O_4S$. [123-28-4]. PM RN 93120.



дидодецил 3,3'-сульфандиилдипропаноат
синонимы: - дидодецил 3,3'-тиодипропионат,
- дидодецил 3,3'-сульфандиилдипропаноат,
- 3,3'-тиобис пропановой кислоты додециловый диэфир,
- лаурилтиодипропионат.

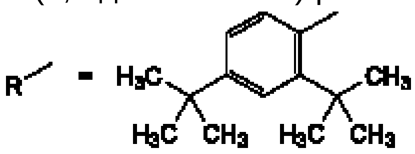
Добавка 17. $C_{42}H_{82}O_4S$. [693-36-7]. PM RN 93280.



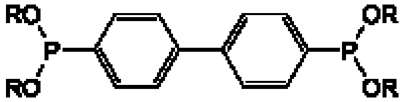
диоктадецил 3,3'-сульфандиилдипропаноат
синонимы: - диоктадецил 3,3'-тиодипропионат**,**
- диоктадецил 3,3'-сульфандиилдипропаноат,
- 3,3'-тиобис пропановой кислоты октадециловый диэфир,
- стеарилтиодипропионат.

Добавка 18. . [119345-01-6]. PM RN 92560.

Смесь семи продуктов, соответствующих продукту реакции ди-*трет*-бутилфосфониту с бифосфора трихлоридом, продуктом реакции с бифенилом и 2,4-бис(1,1-диметилэтил)фенолом:

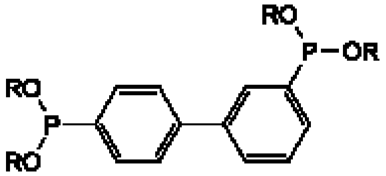


компонент I



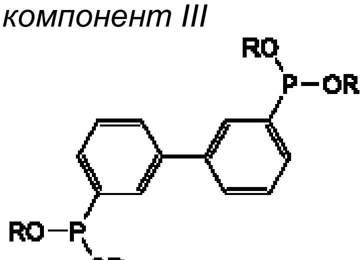
2,4-бис(1,1-диметилэтил)фенилбифенил-4,4′-диилдифосфонит

компонент II



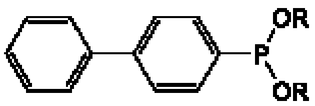
2,4-бис(1,1-диметилэтил)фенилбифенил-3,4′-диилдифосфонит

компонент III



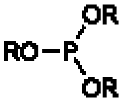
2,4-бис(1,1-диметилэтил)фенилбифенил-3,3′-диилдифосфонит

компонент IV



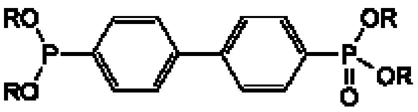
2,4-бис(1,1-диметилэтил)фенилбифенил-4-илфосфонит

компонент V



2,4-бис(1,1-диметилэтил)фенилфосфит

компонент VI

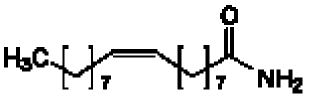


2,4-bis(1,1-диметилэтил)фенил 4′-[бис[2,4-бис(1,1-диметилэтил)фенокси] фосфанил]бифенил-4-илфосфонат
component VII
R-OH: 2,4-бис(1,1-диметилэтил)фенол.

Добавка 19. $C_{18}H_{36}O_2$. [57-11-4]. PM RN 24550.

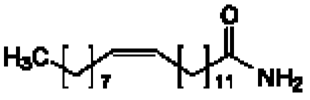
октадекановая кислота
синонимы: - стеариновая кислота,
- октадекановая кислота.

Добавка 20. $C_{18}H_{35}NO$. [301-02-0]. PM RN 68960.



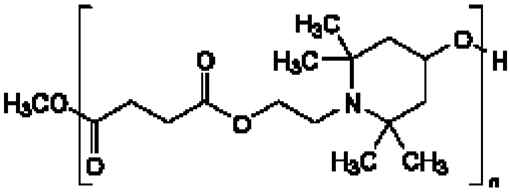
(Z)-октадец-9-энамид
синонимы: - олеамид,
- 9-октадеценамид,(Z)-
- 9-цис-олеамид.

Добавка 21. $C_{22}H_{43}NO$. [112-84-5]. PM RN 52720.



(Z)-докоз-9-энамид
синонимы: - эрукамид,
- 13-докозенамид,(Z)-
- 13-цис-докозенамид.

Добавка 22. [65447-77-0]. PM RN 60800.



сополимер диметилбутандионата и 1-(2-гидроксиэтил)-2,2,6,6-тетраметилпиперидин-4-ол

синонимы: - сополимер диметилсукцината и (4-гидрокси-2,2,6,6-тетраметил пиперидин-1-ил)этанол

3.1.14. МАТЕРИАЛЫ НА ОСНОВЕ ПЛАСТИФИЦИРОВАННОГО ПОЛИВИНИЛХЛОРИДА ДЛЯ КОНТЕЙНЕРОВ ДЛЯ ВОДНЫХ РАСТВОРОВ ДЛЯ ВНУТРИВЕННОГО ПРИМЕНЕНИЯ

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Материалы на основе пластифицированного поливинилхлорида содержат не менее 55% высокомолекулярного полимера – поливинилхлорида, полученного полимеризацией винилхлорида, и разные добавки.

Материалы на основе пластифицированного поливинилхлорида для контейнеров для водных растворов для внутривенного применения характеризуются их природой и пропорцией веществ, которые используют при их производстве.

ПРОИЗВОДСТВО

Материалы на основе пластифицированного поливинилхлорида получают методами полимеризации, которые гарантируют остаточное содержание винилхлорида менее 1 ppm. Данный метод получения может быть валидирован для доведения соответствия продукта требованиям следующего испытания:

Винилхлорид. Не более 1 ppm. Определение проводят методом парофазной газовой хроматографии *(2.2.28)*, используя в качестве внутреннего стандарта *эфир Р.*

Раствор внутреннего стандарта. К 20,0 мл *диметилацетамида Р* с помощью микрошприца добавляют 10 мкл *эфира Р*, погружая конец иглы в растворитель. Непосредственно перед использованием разбавляют раствор *диметилацетамидом Р* в 1000 раз.

Испытуемый раствор. Во флакон вместимостью 50 мл помещают 1,000 г испытуемого материала и прибавляют 10,0 мл раствора внутреннего стандарта. Герметично закрывают флакон пробкой. Встряхивают, избегая контакта жидкости с пробкой. Помещают флакон на водяную баню при температуре $(60 \pm 1)^{0}$С и выдерживают в течение 2 ч.

Основной раствор винилхлорида. Готовят в вытяжном шкафу. Во флакон вместимостью 50 мл помещают 50,0 мл *диметилацетамида Р*, герметично закрывают пробкой и взвешивают с точностью до 0,1 мг. Наполняют полиэтиленовый или полипропиленовый шприц вместимостью 50 мл газообразным *винилхлоридом Р*, оставляют шприц в контакте с газом в течение 3 мин, затем газ удаляют и снова наполняют шприц 50,0 мл газообразного *винилхлорида Р*. Подбирают для шприца гиподермальную иглу и уменьшают объем раствора в шприце до 25 мл. Медленно вводят оставшиеся 25 мл винилхлорида во флакон, осторожно встряхивая и избегая контакта жидкости с иглой. Опять взвешивают флакон. Увеличение массы должно составлять около 60 мг (1 мкл раствора содержит около 1,2 мкг винилхлорида). Оставляют на 2 ч. Хранят основной раствор в холодильнике.

Стандартный раствор винилхлорида. К 1 объему основного раствора винилхлорида прибавляют 3 объема *диметилацетамида Р*.

Растворы сравнения. В 6 одинаковых флаконов вместимостью 50 мл помещают по 10,0 мл раствора внутреннего стандарта. Флаконы герметично закрывают пробками. В 5 флаконов прибавляют соответственно 1 мкл, 2 мкл, 3 мкл, 5 мкл и 10 мкл стандартного раствора винилхлорида. Полученные таким образом 6 растворов содержат соответственно 0 мкг, около 0,3 мкг, 0,6 мкг, 0,9 мкг, 1,5 мкг и 3 мкг винилхлорида. Встряхивают, избегая контакта жидкости с пробкой. Помещают флаконы на водяную баню при температуре (60±1)^{0}C и выдерживают в течение 2 ч.

Условия хроматографирования:

- колонка из нержавеющей стали длиной 3 м, с внутренним диаметром 3 мм, заполненная сорбентом *диатомит силанизированный для газовой хроматографии Р,* импрегнированным 5 % *(м/м) диметилстеариламида Р* и 5 % *(м/м) макроголя 400 Р*;
- газ–носитель – *азот для хроматографии Р*; скорость газа–носителя – 30 мл/мин;
- детектор пламенно-ионизационный;
- температура колонки – 45^{0}C;
- температура блока ввода проб – 100^{0}C;
- температура детектора – 150^{0}C.

Хроматографируют по 1 мл паровой фазы из каждого флакона. Рассчитывают содержание винилхлорида.

Добавки

В полимеры вводят некоторое количество добавок для оптимизации их химических, физических и механических качеств с целью дальнейшего их использования по назначению. Все добавки выбирают из нижеследующего перечня, который определяет для каждого вещества максимально допустимое его содержание:

- не более 40 % ди(2-этилгексил)фталата (добавка к пластмассе 01);
- не более 1 % цинка октаноата (цинка 2-этилгексаноата) (добавка к пластмассе 02);
- не более 1 % кальция стеарата или цинка стеарата или не более 1 % смеси этих веществ;
- не более 1 % *N,N'*-диацилетилендиаминов (добавка к пластмассе 03);
- не более 10 % одного из следующих эпоксидированных масел или не более 10 % смеси двух компонентов:
- эпоксидированного соевого масла (добавка к пластмассе 04) с содержанием кислорода в эпоксидной группе 6-8 % и кислотным числом не более 6;
- эпоксидированного льняного масла (добавка к пластмассе 05) с содержанием кислорода в эпоксидной группе не более 10 % и йодным числом не более 7.

При добавлении красящих веществ используют ультрамарин синий. Могут быть добавлены другие неорганические пигменты с условием, что компетентный уполномоченный орган гарантирует безопасность материала при введении таких добавок. В полимере могут быть определены очень малые количества антиоксидантов, добавленные к винилхлоридному мономеру.

Поставщик материала несет ответственность за то, чтобы качественный и количественный состав типового образца соответствовал качественному и количественному составу каждой произведенной серии.

ОПИСАНИЕ

Порошок, шарики, гранулы бесцветные или бледно – желтые или, после трансформации, полупрозрачные пластинки разной толщины со слабым запахом. При сжигании выделяется густой, черный дым.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ

Если необходимо, образцы испытуемого материала разрезают на части с максимальной длиной стороны не более 1 см.

К 2,0 г испытуемого материала прибавляют 200 мл *эфира, свободного от пероксидов Р,* и нагревают с обратным холодильником в течение 8 ч. Отделяют осадок В от раствора А фильтрованием. Выпаривают раствор А до сухого остатка при пониженном давлении на водяной бане при температуре 30^{0}С. Остаток растворяют в 10 мл *толуола Р* (раствор А1). Осадок В растворяют в 60 мл *этиленхлорида Р*, нагревая на водяной бане с обратным холодильником. Фильтруют. Полученный раствор по каплям и при интенсивном встряхивании прибавляют к 600 мл *гептана Р*, нагретого почти до кипения. Коагулят В1 и органический раствор разделяют горячим фильтрованием. Охлаждают последний, отделяют образующийся осадок В2 и фильтруют через стеклянный фильтр (40).

А. Коагулят В1 растворяют в 30 мл *тетрагидрофурана Р* и прибавляют небольшими порциями при встряхивании 40 мл *этанола Р*. Отделяют осадок В3 фильтрованием и сушат в вакууме над *фосфора (V) оксидом Р* при температуре, не превышающей 50^{0}С. Растворяют несколько миллиграммов осадка В3 в 1 мл *тетрагидрофурана Р*, помещают несколько капель полученного раствора на диск натрия хлорида и выпаривают досуха в сушильном шкафу при температуре (100-105)^{0}С. Инфракрасный спектр *(2.2.24)* испытуемого материала сравнивают со спектром *поливинилхлорида ФСО*.

В. Сравнивают инфракрасный спектр *(2.2.24)* осадка С, полученного в испытании на добавки к пластмассе 01, 04 и 05 со спектром *добавки к пластмассе 01 ФСО.*

ИСПЫТАНИЯ

Если необходимо, образцы испытуемого материала разрезают на части с максимальной длиной стороны не более 1 см.

Раствор S1. 5,0 г испытуемого материала помещают в колбу для сжигания. Прибавляют 30 мл *кислоты серной Р* и нагревают до получения черной, сиропообразной массы. Охлаждают и прибавляют 10 мл *раствора водорода пероксида концентрированного Р*. Осторожно нагревают. Охлаждают раствор и добавляют 1 мл *раствора водорода пероксида концентрированного Р*; повторяют поочередно выпаривание и добавление раствора водорода пероксида до получения бесцветной жидкости. Уменьшают объем раствора до 10 мл. Охлаждают и доводят объем до 50,0 мл *водой Р*.

Раствор S2. 25,0 мг испытуемого материала помещают в колбу из боросиликатного стекла. Прибавляют 500 мл *воды для инъекций Р* и закрывают горло колбы лабораторным стаканом из боросиликатного стекла. Нагревают в автоклаве при температуре (121±2)^{0}С в течение 20 мин. Охлаждают и декантируют раствор.

Внешний вид раствора S2. Раствор S2 должен быть прозрачным *(2.2.1)* и бесцветным *(2.2.2, Метод II)*.

Кислотность или щелочность. К 100 мл раствора S2 прибавляют 0,15 мл *раствора BRP индикатора Р*. Для изменения окраски раствора на синюю должно потребоваться не более 1,5 мл *0,01 М раствора натрия гидроксида*. К 100 мл раствора S2 прибавляют 0,2 мл *раствора метилового оранжевого Р*. Для изменения желтой окраски раствора на оранжевую должно потребоваться не более 1,0 мл *0,01 М раствора кислоты хлористоводородной*.

Оптическая плотность *(2.2.25)*. 100,0 мл раствора S2 выпаривают досуха. Осадок растворяют в 5,0 мл *гексана Р*. Оптическая плотность раствора в диапазоне длин волн от 250 нм до 310 нм не должна превышать 0,25.

Восстановители. *Испытание проводят в течение 4 ч после приготовления раствора S2*. К 20,0 мл раствора S2 прибавляют 1 мл *кислоты серной разведенной Р* и 20,0 мл *0,002 М раствора калия перманганата*. Кипятят с обратным холодильником в течение 3 мин и немедленно охлаждают. Прибавляют 1 г *калия йодида Р* и немедленно титруют раствор *0,01 М раствором натрия тиосульфата*, используя в качестве индикатора 0,25 мл *раствора крахмала Р*. Параллельно проводят контрольный опыт, используя 20 мл *воды для инъекций Р*. Разность между объемами титранта не должна превышать 2,0 мл.

Первичные ароматические амины. К 2,5 мл раствора А1, полученного при проведении идентификации, прибавляют 6 мл *воды Р* и 4 мл *0,1 М раствора кислоты хлористоводородной*. Интенсивно встряхивают и удаляют верхний слой. К водному слою прибавляют 0,4 мл свежеприготовленного раствора 10 г/л *натрия нитрита Р*. Перемешивают и оставляют для настаивания в течение 1 мин. Прибавляют 0,8 мл раствора 25 г/л *аммония сульфамата Р*, оставляют для настаивания в течение 1 мин, затем прибавляют 2 мл раствора 5 г/л *нафтилэтилендиамина дигидрохлорида Р*. Через 30 мин окрашивание полученного раствора должно быть не более интенсивным, чем окрашивание стандарта, приготовленного параллельно, аналогичным образом, но с использованием вместо водного слоя смеси 1 мл раствора 0,01 г/л *нафтиламина Р* в *0,1 М растворе кислоты хлористоводородной*, 5 мл *воды Р* и 4 мл *0,1 М раствора кислоты хлористоводородной* (20 ppm).

Добавки к пластмассе 01, 04 и 05. Определение проводят методом тонкослойной хроматографии *(2.2.27)*, используя в качестве неподвижной фазы *ТСХ пластину со слоем силикагеля* GF_{254} *Р* (толщиной 1 мм).

Растворы сравнения. Готовят растворы 0,1 мг/мл *добавки к пластмассе 01 ФСО*, *добавки к пластмассе 04 ФСО* и *добавки к пластмассе 05 ФСО*, соответственно, в *толуоле Р*.

На линию старта хроматографической пластины в виде полосы размером 30 мм × 3 мм наносят 0,5 мл раствора A1, полученного при проведении идентификации. Наносят на пластину по 5 мкл каждого из растворов сравнения. Помещают пластину в хроматографическую камеру, содержащую в качестве подвижной фазы *толуол Р*. Когда расстояние, пройденное подвижной фазой от линии старта, составит 15 см, пластину вынимают, осторожно высушивают. Анализируют в УФ – свете при длине волны 254 нм, определяя положение зоны, соответствующей добавке к пластмассе 01 (R_f около 0,4). Собирают силикагель с этой зоны и встряхивают с 40 мл *эфира Р* в течение 1 мин. Фильтруют, промывают фильтр двумя порциями, каждая по 10 мл, *эфира Р*, добавляют их к фильтрату и выпаривают досуха. Масса остатка C не должна превышать 40 мг. Обрабатывают пластину парами йода в течение 5 мин. Анализируют хроматограмму, определяя положение зоны, соответствующей добавкам к пластмассе 04 и 05 (R_f =0). Собирают силикагель с данной зоны. Аналогично собирают с идентичной по размеру зоны силикагель для контрольного опыта. Раздельно встряхивают оба образца в течение 15 мин с 40 мл *метанола Р*. Фильтруют, промывают фильтр двумя порциями, каждая по 10 мл, *метанола Р*, добавляя их к фильтрату, и выпаривают досуха. Разность между массами остатков не должна превышать 10 мг.

Добавка к пластмассе 03. Осадок B2, полученный при проведении идентификации и находящийся на предварительно взвешенном стеклянном фильтре (40), промывают *этанолом Р*. Фильтр высушивают до постоянной массы над *фосфора (V) оксидом Р* и взвешивают. Масса остатка не должна превышать 20 мг.

Инфракрасный спектр *(2.2.24)* остатка должен соответствовать спектру *добавки к пластмассе 03 ФСО*.

Барий. Не более 5 ppm Ba. Определение проводят методом атомно-эмиссионной спектрометрии в среде аргона *(2.2.22, Метод I)*.

Испытуемый раствор. 1,0 г испытуемого материала прокаливают в кварцевом тигле. Остаток растворяют в 10 мл *кислоты хлористоводородной Р* и выпаривают досуха на водяной бане. Полученный остаток растворяют в 20 мл *0,1 М раствора кислоты хлористоводородной*.

Раствор сравнения. Раствор, содержащий 0,25 ppm бария, приготовленный разбавлением *эталонного раствора бария (50 ppm Ba) Р 0,1 М раствором кислоты хлористоводородной*.

Определение проводят, измеряя интенсивность светоиспускания бария при длине волны 455,40 нм, регулируя спектральный фон на уровне 455,30 нм.

Проверяют отсутствие бария в используемой кислоте хлористоводородной.

Кадмий. Не более 0,6 ppm Cd. Определение проводят методом атомно-абсорбционной спектрометрии *(2.2.23, Метод I).*

Испытуемый раствор. Выпаривают досуха 10 мл раствора S1. Остаток растворяют в 5 мл 1 % (*об/об*) раствора *кислоты хлористоводородной Р*, фильтруют и доводят объем фильтрата тем же растворителем до 10,0 мл.

Растворы сравнения. Растворы сравнения готовят разбавлением *эталонного раствора кадмия (0,1 % Cd) Р* 1 % (*об/об*) раствором *кислоты хлористоводородной Р*.

Измеряют оптическую плотность при длине волны 228,8 нм, используя в качестве источника излучения лампу с полым кадмиевым катодом и воздушно-ацетиленовое пламя.

Проверяют отсутствие кадмия в используемой кислоте хлористоводородной.

Кальций. Не более 0,07 % Са. Определение проводят методом атомно-эмиссионной спектрометрии в среде аргона *(2.2.22, Метод I)*.

Испытуемый раствор. Используют испытуемый раствор, приготовленный для определения бария.

Раствор сравнения. Раствор, содержащий 50,0 ppm кальция, приготовленный разбавлением *эталонного раствора кальция (400 ppm Са) Р 0,1 М раствором кислоты хлористоводородной*.

Определение проводят, измеряя интенсивность светоиспускания кальция при длине волны 315,89 нм, регулируя спектральный фон на уровне 315,60 нм.

Проверяют отсутствие кальция в используемой кислоте хлористоводородной.

Олово. Не более 20 ppm Sn. Определение проводят методом атомно-эмиссионной спектрометрии в среде аргона *(2.2.22, Метод I)*.

Испытуемый раствор. Непосредственно перед использованием разбавляют раствор S1 в 10 раз *водой Р*.

Раствор сравнения. Непосредственно перед использованием 2 мл *эталонного раствора олова (5 ppm Sn) Р* помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, содержащую 5 мл 20 % (*об/об*) раствора *кислоты серной Р* и доводят объем раствора *водой Р* до 50 мл.

Определение проводят, измеряя интенсивность светоиспускания олова при длине волны 189,99 нм, регулируя спектральный фон на уровне 190,10 нм.

Проверяют отсутствие олова в используемой кислоте хлористоводородной.

Цинк. Не более 0,2 % Zn. Определение проводят методом атомно-абсорбционной спектрометрии *(2.2.23, Метод I).*

Испытуемый раствор. Раствор S1 разбавляют в 100 раз *0,1 М раствором кислоты хлористоводородной*.

Растворы сравнения. Растворы сравнения готовят разбавлением *эталонного раствора цинка (100 ppm Zn) Р* 0,1 М раствором *кислоты хлористоводородной Р*.

Измеряют оптическую плотность при длине волны 213,9 нм, используя в качестве источника излучения лампу с полым цинковым катодом и воздушно-ацетиленовое пламя.

Проверяют отсутствие цинка в используемой кислоте хлористоводородной.

Тяжелые металлы *(2.4.8)*. К 10,0 мл раствора S1 прибавляют 0,5 мл *раствора фенолфталеина Р* и затем *раствор натрия гидроксида концентрированный Р* до получения бледно-розового окрашивания. Доводят объем раствора до 25 мл *водой Р*. 12 мл полученного раствора соответствует требованиям испытания А на предельное содержание тяжелых металлов (50 ppm). Эталонный раствор готовят, используя *эталонный раствор свинца (2 ppm Pb) Р*.

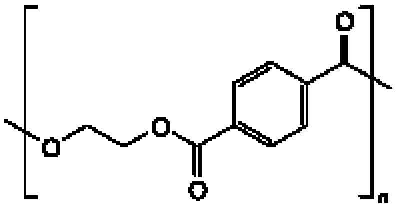
Вещества, экстрагируемые водой. 50,0 мл раствора S2 выпаривают на водяной бане досуха и высушивают в сушильном шкафу при температуре (100-105)^{0}С до постоянной массы. Параллельно проводят контрольный опыт, используя 50,0 мл *воды для инъекций Р*. Масса сухого остатка не должна превышать 7,5 мг (0,3 %) с учетом контрольного теста.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Определение проводят методом сжигания в колбе с кислородом *(2.5.10)*, используя 50,0 мг испытуемого материала. Продукты сжигания растворяют в 20 мл *1 М раствора натрия гидроксида*. К полученному раствору прибавляют 2,5 мл *кислоты азотной Р*, 10,0 мл *0,1 М раствора серебра нитрата*, 5 мл *раствора железа аммония сульфата Р2* и 1 мл *дибутилфталата Р*. Титруют раствор *0,05 М раствором аммония тиоцианата* до получения красновато-желтого окрашивания. Параллельно проводят контрольный опыт.

1 мл *0,1 М раствора серебра нитрата* соответствует 6,25 мг поливинилхлорида.

3.1.15. ПОЛИЭТИЛЕНТЕРЕФТАЛАТ ДЛЯ КОНТЕЙНЕРОВ ДЛЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ ДЛЯ НЕПАРЕНТЕРАЛЬНОГО ПРИМЕНЕНИЯ



n = 100 - 200

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Полиэтилентерефталат получают полимеризацией кислоты терефталевой или диметилтерефталата с этиленгликолем. Для полимеризации могут быть использованы кислота изофталевая, диметилизофталат, 1,4-бис(гидроксиметил)циклогексан (циклогексан-1,4-диметанол) или диэтиленгликоль. Он может содержать не более 0,5% кремния диоксида или силикатов и краситель, разрешенный к применению компетентным уполномоченным органом.

ПРОИЗВОДСТВО

Метод получения может быть валидирован для того, чтобы остаточное содержание ацетальдегида в гранулах не превышало 10 ppm.

ОПИСАНИЕ

Внешний вид: прозрачные или опалесцирующие гранулы.

Растворимость: практически нерастворим в *воде Р*, *спирте Р* и *метиленхлориде Р*. Гидролизуется сильными основаниями.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ

А. 0,10 г испытуемого материала помещают в колбу из боросиликатного стекла с притертой пробкой. Прибавляют 25 мл раствора 200 г/л *калия гидроксида Р* в растворе 50% (*об/об*) *этанола Р*. Кипятят с обратным холодильником в течение 30 мин, охлаждают и доводят объем раствора *водой Р* до 100 мл. Если необходимо, фильтруют. 1,0 мл фильтрата доводят *водой Р* до объема 100 мл. УФ - спектр (*2.2.25*) полученного раствора в области от 210 нм до 330 нм должен иметь максимум при длине волны 240 нм.

В. 0,05 г испытуемого материала растворяют в 2 мл *1,1,1,3,3,3-гексафторпропан-2-ола Р*. Несколько капель раствора наносят на стеклянную пластину, которая находится на водяной бане, в вытяжном шкафу для получения пластины размером около 15 × 15 мм. После выпаривания растворителя пластину удаляют, используя поток воды и скребок. Сушат в сушильном шкафу при температуре от 100^{0}С до 105^{0}С в течение 1-2 ч. Инфракрасный спектр (*2.2.24*) остатка должен иметь максимумы, в частности, при 1725 см$^{-1}$, 1410 см$^{-1}$, 1265 см$^{-1}$, 1120 см$^{-1}$, 1100 см$^{-1}$, 1020 см$^{-1}$, 875 см$^{-1}$ и 725 см$^{-1}$. Полученный спектр должен соответствовать спектру типового образца.

ИСПЫТАНИЯ

Если необходимо, образцы испытуемого материала разрезают на части с максимальной длиной стороны не более 1 см.

Раствор S1. 10,0 г испытуемого материала помещают в колбу из боросиликатного стекла с притертой пробкой. Прибавляют 200 мл *воды Р* и нагревают при температуре 50^{0}С в течение 5 ч. Охлаждают и декантируют раствор. *Раствор S1 используют в течение 4 ч после приготовления.*

Раствор S2. 10,0 г испытуемого материала помещают в колбу из боросиликатного стекла с притертой пробкой. Прибавляют 100 мл *спирта Р* и нагревают при температуре 50^{0}С в течение 5 ч. Охлаждают и декантируют раствор. *Раствор S2 используют в течение 4 ч после приготовления.*

Раствор S3. 20 г испытуемого материала помещают в колбу из боросиликатного стекла с притертой пробкой. Прибавляют 50 мл *0,1 М раствора кислоты хлористоводородной Р* и нагревают при температуре 50^{0}С в течение 5 ч. Охлаждают и декантируют раствор. *Раствор S3 используют в течение 4 ч после приготовления.*

Раствор S4. 20 г испытуемого материала помещают в колбу из боросиликатного стекла с притертой пробкой. Прибавляют 50 мл *0,1 М раствора натрия гидроксида Р* и нагревают при температуре 50^{0}С в течение 5 ч. Охлаждают и декантируют раствор. *Раствор S4 используют в течение 4 часов после приготовления.*

Внешний вид раствора S1. Раствор S1 должен быть прозрачным *(2.2.1)*.

Внешний вид раствора S2. Раствор S2 должен быть прозрачным *(2.2.1)* и бесцветным *(2.2.2, Метод II)*.

Кислотность или щелочность. К 50 мл раствора S1 прибавляют 0,15 мл *раствора BRP индикатора Р*. Раствор окрашивается в желтый цвет. Для изменения окраски раствора на синюю должно потребоваться не более 0,5 мл *0,01 М раствора натрия гидроксида*. К другим 50 мл раствора S1 прибавляют 0,2 мл *раствора метилового оранжевого Р*. Раствор окрашивается в желтый цвет. Для изменения желтой окраски раствора до оранжевой должно потребоваться не более 0,5 мл *0,01 М раствора кислоты хлористоводородной*.

Оптическая плотность раствора S1. *(2.2.25)*. Оптическая плотность раствора S1 в диапазоне длин волн от 220 нм до 340 нм не должна превышать 0,2. Для окрашенного полиэтилентерефталата оптическая плотность раствора S1 в диапазоне длин волн от 400 нм до 800 нм не должна превышать 0,05.

Оптическая плотность раствора S2. *(2.2.25)*. Оптическая плотность раствора S2 в диапазоне длин волн от 400 нм до 800 нм не должна превышать 0,05.

Восстановители. К 20,0 мл раствора S1 прибавляют 2 мл *0,5 М раствора кислоты серной* и 20,0 мл *0,002 М раствора калия перманганата*. Кипятят в течение 3 мин и немедленно охлаждают до комнатной температуры. Прибавляют 1 г *калия йодида Р* и немедленно титруют раствор *0,01 М раствором натрия тиосульфата*, используя в качестве индикатора 0,25 мл *раствора крахмала Р*. Параллельно проводят контрольный опыт, используя 20 мл *воды Р*. Разность между объемами титранта не должна превышать 0,5 мл.

Вещества, растворимые в диоксане: не более 3%.

2 г испытуемого материала помещают в колбу из боросиликатного стекла с притертой пробкой. Прибавляют 20 мл *диоксана Р* и кипятят с обратным холодильником на водяной бане в течение 2 ч. 10 мл полученного раствора выпаривают на водяной бане досуха и сушат остаток при температуре от 100^{0}С до 105^{0}С. Масса полученного остатка не должна превышать 30 мг.

Экстрагируемый алюминий. Не более 1 ppm экстрагируемого Al. Определение проводят методом атомно-эмиссионной спектрометрии в среде аргона *(2.2.22, Метод I)*.

Испытуемый раствор. Используют раствор S3.

Раствор сравнения. Готовят разбавлением *эталонного раствора алюминия (200 ppm Al) Р 0,1 М раствором кислоты хлористоводородной*.

Измеряют интенсивность светоиспускания алюминия при длине волны 396,15 нм, регулируя спектральный фон на уровне 396,25 нм.

Проверяют отсутствие алюминия в используемом *0,1 М растворе кислоты хлористоводородной.*

Экстрагируемая сурьма. Не более 1 ppm экстрагируемой Sb. Определение проводят методом атомно-эмиссионной спектрометрии в среде аргона *(2.2.22, Метод I).*

Испытуемый раствор. Используют раствор S4.

Раствор сравнения. Готовят разбавлением *эталонного раствора сурьмы (100 ppm Sb) Р 0,1 М раствором натрия гидроксида*.

Измеряют интенсивность светоиспускания сурьмы при длине волны 231,15 нм или 217,58 нм, регулируя спектральный фон на уровне 231,05 нм.

Экстрагируемый барий. Не более 1 ppm экстрагируемого Ва. Определение проводят методом атомно-эмиссионной спектрометрии в среде аргона *(2.2.22, Метод I).*

Испытуемый раствор. Используют раствор S3.

Раствор сравнения. Готовят разбавлением *эталонного раствора бария (50 ppm Ba) Р 0,1 М раствором кислоты хлористоводородной*.

Измеряют интенсивность светоиспускания бария при длине волны 455,40 нм, регулируя спектральный фон на уровне 455,30 нм.

Проверяют отсутствие бария в используемом *0,1 М растворе кислоты хлористоводородной.*

Экстрагируемый кобальт. Не более 1 ppm экстрагируемого Со. Определение проводят методом атомно-эмиссионной спектрометрии в среде аргона *(2.2.22, Метод I).*

Испытуемый раствор. Используют раствор S3.

Раствор сравнения. Готовят разбавлением *эталонного раствора кобальта (100 ppm Co) Р 0,1 М раствором кислоты хлористоводородной*.

Измеряют интенсивность светоиспускания кобальта при длине волны 288,62 нм, регулируя спектральный фон на уровне 288,50 нм.

Проверяют отсутствие кобальта в используемом *0,1 М растворе кислоты хлористоводородной.*

Экстрагируемый германий. Не более 1 ppm экстрагируемого Ge. Определение проводят методом атомно-эмиссионной спектрометрии в среде аргона *(2.2.22, Метод I).*

Испытуемый раствор. Используют раствор S4.

Раствор сравнения. Готовят разбавлением *эталонного раствора германия (100 ppm Ge) Р 0,1 М раствором натрия гидроксида*.

Измеряют интенсивность светоиспускания германия при длине волны 206,87 нм или 265,12 нм, регулируя спектральный фон на уровне 206,75 нм.

Экстрагируемый марганец. Не более 1 ppm экстрагируемого Mn. Определение проводят методом атомно-эмиссионной спектрометрии в среде аргона *(2.2.22, Метод I).*

Испытуемый раствор. Используют раствор S3.

Раствор сравнения. Готовят разбавлением *эталонного раствора марганца (100 ppm Mn) Р 0,1 М раствором кислоты хлористоводородной*.

Измеряют интенсивность светоиспускания марганца при длине волны 257,61 нм, регулируя спектральный фон на уровне 257,50 нм.

Проверяют отсутствие марганца в используемом *0,1 М растворе кислоты хлористоводородной.*

Экстрагируемый титан. Не более 1 ppm экстрагируемого Ti. Определение проводят методом атомно-эмиссионной спектрометрии в среде аргона *(2.2.22, Метод I).*

Испытуемый раствор. Используют раствор S3.

Раствор сравнения. Готовят разбавлением *эталонного раствора титана (100 ppm Ti) Р 0,1 М раствором кислоты хлористоводородной*.

Измеряют интенсивность светоиспускания титана при длине волны 323,45 нм или 334,94 нм, регулируя спектральный фон на уровне 323,35 нм.

Проверяют отсутствие титана в используемом *0,1 М растворе кислоты хлористоводородной.*

Экстрагируемый цинк. Не более 1 ppm экстрагируемого Zn. Определение проводят методом атомно-абсорбционной спектрометрии в среде аргона *(2.2.23, Метод I)*.

Испытуемый раствор. Используют раствор S3.

Раствор сравнения. Готовят разбавлением *эталонного раствора цинка (100 ppm Zn) Р 0,01 М раствором кислоты хлористоводородной*.

Измеряют интенсивность светоиспускания цинка при длине волны 213,86 нм, регулируя спектральный фон на уровне 213,75 нм.

Проверяют отсутствие цинка в используемом *0,1 М растворе кислоты хлористоводородной.*

Сульфатная зола (*2.4.14*). Не более 0,5%. Определение проводят из 1,0 г испытуемого материала.

3.2. КОНТЕЙНЕРЫ

Контейнер для фармацевтического использования представляет собой изделие, которое содержит продукцию или предназначен для ее хранения и находится или может находиться в непосредственном контакте с ней. Укупорочное средство является частью контейнера.

Контейнер (см. *1.3. Общие статьи*) изготавливают таким образом, чтобы содержимое могло быть извлечено способом, соответствующим надлежащему применению лекарственного средства. Он обеспечивает разную степень защиты в зависимости от свойств продукции и действия факторов окружающей среды и доводит до минимума потери компонентов. Контейнер не должен вступать в физическое или химическое взаимодействие с содержимым таким образом, чтобы изменять показатели его качества по отношению к требуемым показателям.

Однодозовый контейнер. Контейнер, который содержит количество лекарственного средства, соответствующее полностью или по частям для одноразового применения.

Мультидозовый контейнер. Контейнер, который содержит количество лекарственного средства, соответствующее двум или более дозам.

Укупоренный контейнер. Контейнер, который защищает содержимое от загрязнения извне твердыми веществами и жидкостями, а также от потери компонентов в обычных условиях при применении, хранении и транспортировке.

Воздухонепроницаемый контейнер. Контейнер, который непроницаем для твердых веществ, жидкостей и газов в обычных условиях при применении, хранении и транспортировке. Если контейнер содержит более одной дозы лекарственного средства и может быть открыт неоднократно, то после повторного закупоривания он должен оставаться воздухонепроницаемым.

Герметично укупоренный контейнер. Контейнер, укупоренный с помощью расплавления материала контейнера.

Контейнер с контролем первого вскрытия. Закрытый контейнер, обеспеченный приспособлением для контроля его первого вскрытия.

Контейнер, защищенный от вскрытия детьми. Закрытый контейнер, снабженный системой укупоривания, исключающей возможность вскрытия детьми.

3.2.1. СТЕКЛЯННЫЕ КОНТЕЙНЕРЫ ДЛЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Стеклянные контейнеры для фармацевтического использования – изделия из стекла, которые непосредственно контактируют с лекарственными средствами.

Существуют следующие типы стеклянных контейнеров:

Ампулы. Тонкостенные стеклянные контейнеры, которые после наполнения укупориваются запаиванием стекла. Содержимое ампулы предназначено для одноразового введения после вскрытия ампулы.

Флаконы, пузырьки, шприцы и карпулы. Более или менее толстостенные контейнеры с пробками из стекла или другого материала, например, из пластмассы или эластомеров. Содержимое может быть изъято несколькими порциями за один или несколько раз.

Контейнеры, предназначенные для человеческой крови и ее компонентов. Более или менее толстостенные цилиндрические контейнеры различной емкости из бесцветного и прозрачного нейтрального стекла.

Качество стекла

Бесцветное стекло имеет высокую светопроницаемость в видимой части спектра.

Цветное стекло получают добавлением небольших количеств оксидов металлов, выбранных согласно желаемым спектральным характеристикам.

Нейтральное стекло представляет собой боросиликатное стекло, содержащее определенное количество бора, а также алюминия оксида или оксидов щелочноземельных металлов. Благодаря своему составу нейтральное стекло характеризуется высокой термической и гидролитической устойчивостью.

Силикатное стекло – стекло на основе кремния оксида, содержащее оксиды щелочных металлов, главным образом оксид натрия, и оксиды щелочноземельных металлов, главным образом оксид кальция. Благодаря своему составу силикатное стекло характеризуется только средней гидролитической устойчивостью.

Химическая стабильность стеклянных контейнеров для фармацевтического использования выражается гидролитической устойчивостью, т.е. устойчивостью к выделению растворимых минеральных веществ в воду в обычных условиях при контакте внутренней поверхности контейнера или порошкообразного стекла с водой. Гидролитическая устойчивость оценивается титрованием выделившейся щелочи.

В зависимости от гидролитической устойчивости стеклянные контейнеры классифицируют следующим образом:

- Контейнеры из стекла класса I.	Изготовлены из нейтрального стекла и имеют высокую гидролитическую устойчивость благодаря химическому составу самого стекла.
- Контейнеры из стекла класса II.	Изготовлены обычно из силикатного стекла и имеют высокую гидролитическую устойчивость благодаря специальной обработке поверхности.

- Контейнеры из стекла класса III. Изготовлены обычно из силикатного стекла и имеют среднюю гидролитическую устойчивость.
- Контейнеры из стекла класса IV. Изготовлены обычно из силикатного стекла и имеют низкую гидролитическую устойчивость.

Следующие ниже и набранные курсивом общие рекомендации к отдельным классам стеклянных контейнеров могут быть применены к разным видам лекарственных средств. Производитель лекарственного средства несет ответственность за обеспечение пригодности выбранного контейнера.

Контейнеры из стекла класса I пригодны для хранения всех видов лекарственных средств, предназначенных для парентерального и непарентерального применения, а также для человеческой крови и ее компонентов.

Контейнеры из стекла класса II пригодны для хранения кислых и нейтральных водных растворов для парентерального применения.

Контейнеры из стекла класса III пригодны для хранения неводных растворов и порошков для парентерального применения, а также для лекарственных средств для непарентерального применения.

Контейнеры из стекла класса IV пригодны для хранения твердых, некоторых жидких или мягких лекарственных средств для непарентерального применения.

Как правило, также могут быть использованы стеклянные контейнеры, имеющие гидролитическую устойчивость выше требуемой для конкретного лекарственного средства.

Для лекарственных средств, не предназначенных для парентерального применения, могут использоваться контейнеры из бесцветного или цветного стекла. Лекарственные средства для парентерального применения обычно выпускают в контейнерах из бесцветного стекла, для субстанций, чувствительных к свету, может использоваться цветное стекло. Рекомендуется, чтобы стеклянные контейнеры для жидких лекарственных форм и порошков для парентерального применения допускали визуальный контроль содержимого контейнера.

Внутренняя поверхность стеклянных контейнеров может быть специально обработана для увеличения гидролитической устойчивости, придания водоотталкивающих свойств и др. Внешняя поверхность также может быть обработана для уменьшения трения и увеличения сопротивления к механическим повреждениям. Обработка внешней поверхности должна проводиться так, чтобы исключить загрязнение внутренней поверхности контейнера.

Стеклянные контейнеры, за исключением контейнеров из стекла I класса, не могут быть использованы повторно. Контейнеры для человеческой крови и ее компонентов не могут быть использованы повторно.

Стеклянные контейнеры для фармацевтического использования должны выдерживать испытания на гидролитическую устойчивость. Если стеклянные кон-

тейнеры имеют детали, изготовленные из другого материала, то испытания проводятся только на стеклянных частях контейнера.

ИСПЫТАНИЯ

Для определения качества стеклянного контейнера в зависимости от его предназначения проводят одно или более следующих испытаний.

ГИДРОЛИТИЧЕСКАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ

Оборудование и реактивы

- Ступка, пестик (см. Рисунок 3.2.1.-1) и молоток из умеренно магнитной стали.

- Комплект из трех сит с квадратными отверстиями из нержавеющей стали, закрепленных на рамах из того же материала в следующем порядке:
  a) сито № 710
  b) сито № 425
  c) сито № 250

- Постоянный магнит.

- Колбы и пробки из нейтрального стекла, подверженные «старению», т.е. колбы и пробки, уже используемые для испытаний или колбы, предварительно заполненные *водой Р* и выдержанные в автоклаве при температуре 121^{0}С в течение не менее 1 ч.

- Фольга из инертного материала (например, алюминия).

- Автоклав, способный поддерживать температуру (121±1)^{0}С, оснащенный термометром, клапаном давления, вентиляционным краном и поддоном, а также имеющей достаточную емкость для размещения над уровнем воды такого количества контейнеров, которое необходимо для проведения испытания.

- Сушильный шкаф, способный поддерживать температуру (110±5)^{0}С.

- Весы для взвешивания до 500 г с точностью до 0,005 г.

- *Вода, свободная от углекислого газа Р.*

- *Раствор метилового красного Р.*

- *0,01 М раствор кислоты хлористоводородной.*

- *Ацетон Р.*

- Смесь, содержащая 1 объем *кислоты фтористоводородной Р* и 9 объемов *кислоты хлористоводородной Р*.

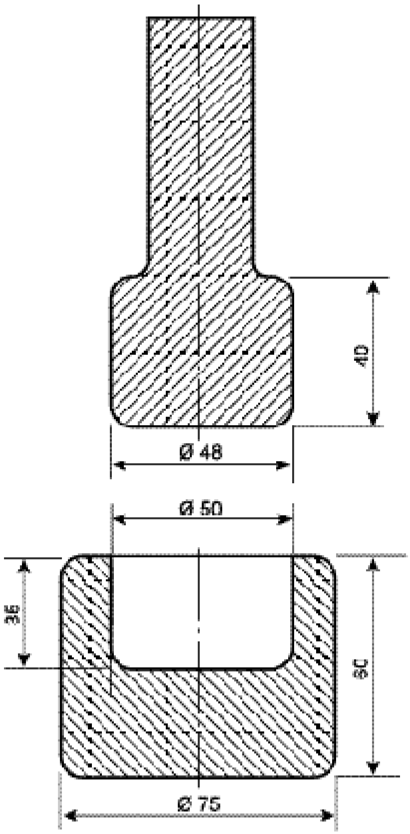


Рисунок 3.2.1.-1 – Аппарат для измельчения стекла в порошок. Размеры указаны в миллиметрах

Объем наполнения. Объем наполнения – это объем воды, которой наполняют контейнер для проведения испытания. Для пузырьков и флаконов объем наполнения составляет 90 % от объема наполнения до краев контейнера. Для ампул – это объем до высоты плеча.

А. Испытание на поверхностную гидролитическую устойчивость

Определение проводится на контейнерах, не используемых ранее. Количество испытуемых контейнеров и необходимый объем жидкости для конечного испытания указаны в таблице 3.2.1.-1.

Таблица 3.2.1.-1.

Количество контейнеров и объем испытуемой жидкости

Объем наполнения, мл	**Количество контейнеров**	**Объем испытуемой жидкости для титрования, мл**
До 3	Не менее 10	25,0
От 3 до 30	Не менее 5	50,0
Выше 30	Не менее 3	100,0

Методика. Непосредственно перед испытанием, каждый контейнер тщательно промывают не менее трех раз *водой Р*, дают стечь и наполняют контейнер *водой Р* в объеме, равном объему наполнения. Пузырьки или флаконы закрывают чашками из нейтрального стекла или алюминиевой фольгой, предварительно промытыми водой Р. Ампулы герметизируют с помощью запаивания. Контейнеры помещают на поддон автоклава и затем в автоклав, содержащий такое количест-

во *воды P*, чтобы поддон с ней не соприкасался. Закрывают автоклав и выполняют последовательно следующие операции:

- Нагревают автоклав до температуры 100^{0}С и выпускают пар через вентиль в течение 10 мин,
- Повышают температуру от 100^{0}С до 121^{0}С в течение 20 мин,
- Поддерживают температуру на уровне (121±1)^{0}С в течение 60 мин,
- Снижают температуру от 121^{0}С до 100^{0}С в течение 40 мин, не допуская образования вакуума.

Контейнеры вынимают из автоклава, выполняя меры предосторожности, и охлаждают под проточной водопроводной водой. Титрование выполняют через 1 ч после извлечения контейнеров из автоклава. Объединяют жидкости из контейнеров и перемешивают. В коническую колбу помещают необходимый объем жидкости (Табл. 3.2.1.-1). В другую идентичную колбу помещают такой же объем *воды P* (контрольный раствор). Добавляют в каждую колбу по 0,05 мл раствора *метилового красного P* на каждые 25 мл жидкости. Титруют контрольный раствор *0,01 М раствором кислоты хлористоводородной*. Испытуемую жидкость также титруют *0,01 М раствором кислоты хлористоводородной* до тех пор, пока цвет раствора не станет аналогичен цвету, полученному в контрольном опыте. Находят разность объемов титранта, израсходованных на титрование испытуемой жидкости и контрольного раствора и выражают ее в миллилитрах *0,01 М раствора кислоты хлористоводородной* на 100 мл.

Пределы. Результаты не должны превышать значений, приведенных в таблице 3.2.1.-2.

Таблица 3.2.1.-2.

Допустимые пределы при определении поверхностной гидролитической устойчивости

Объем наполнения, мл	**Объем 0,01 М раствора HCl в миллилитрах на 100 мл испытуемой жидкости**	
	Контейнеры из стекла	
	класса I и II	**класса III**
До 1	2,0	20,0
От 1 до 2	1,8	17,6
От 2 до 5	1,3	13,2
От 5 до 10	1,0	10,2
От 10 до 20	0,80	8,1
От 20 до 50	0,60	6,1
От 50 до 100	0,50	4,8
От 100 до 200	0,40	3,8
От 200 до 500	0,30	2,9
Выше 500	0,20	2,2

В. Испытание на гидролитическую устойчивость измельченного в порошок стекла

Методика. Испытуемые контейнеры промывают *водой P* и высушивают в сушильном шкафу. Около 100 г стекла не менее чем от трех контейнеров измельчают молотком так, чтобы размер частиц не превышал 25 мм. Часть образца переносят в ступку. Вводят пестик и сильно ударяют один раз молотком. Содержимое ступки переносят на сито (a) с наибольшим диаметром пор из комплекта. Повторяют операцию необходимое количество раз для полного переноса образца на

сито. Быстро просеивают. Остаток, не прошедший через поры сит (а) и (b), удаляют. Затем фракционируют, повторяя операцию до тех пор, пока на сите (а) останется около 20 г стекла. Порцию образца, оставшуюся на сите (а), и порцию, прошедшую через поры сита (с), удаляют. Встряхивают комплект сит вручную или механически в течение 5 мин. Сохраняют порцию образца, прошедшую через сито (b), но оставшуюся на сите (с). Удаляют из этой порции какие-либо металлические частички, проводя над ней магнитом. Около 22 г порции переносят в коническую колбу и промывают 60 мл *ацетона Р*. Встряхивают до образования суспензии и отделяют надосадочную жидкость. Повторяют операцию 5 раз. Частички стекла переносят в выпарительную чашку. Выпаривают ацетон, высушивают в сушильном шкафу при температуре 110^0С в течение 20 мин и охлаждают.

20,00 г высушенных частиц стекла помещают в коническую колбу вместимостью 250 мл. Прибавляют 100 мл *воды Р* и взвешивают. В другую идентичную колбу помешают 100 мл *воды Р* (контрольный раствор) и взвешивают. Закрывают обе колбы чашками из нейтрального стекла или алюминиевой фольгой, промытыми предварительно *водой Р*. Контролируют, чтобы частички стекла равномерно распределились по дну колбы. Помещают колбы в автоклав и выдерживают при температуре 121^0С в течение 30 мин, выполняя операции, аналогичные выполняемым при проведении испытания А на поверхностную гидролитическую устойчивость. После охлаждения удаляют пробки, аккуратно протирают колбы и доводят *водой Р* до исходной массы.

Титрование. 50,0 мл надосадочной жидкости (что соответствует 10,0 г стеклянных частиц) помещают в коническую колбу. Готовят контрольный раствор в идентичной колбе, используя 50 мл *воды Р*. В каждую колбу прибавляют по 0,1 мл *раствора метилового красного Р* и титруют *0,01 М раствором кислоты хлористоводородной*. Титруют испытуемую жидкость тем же титрантом до окрашивания аналогичного полученному в контрольном опыте. Находят разность между объемами титранта, израсходованными на титрования испытуемой жидкости и контрольного раствора и выражают результат в миллилитрах *0,01 М раствора кислоты хлористоводородной* на 10,0 г стекла.

Пределы. Для контейнеров из стекла класса I на титрование должно израсходоваться не более 2,0 мл, для контейнеров из стекла класса II или класса III – не более 17,0 мл и для контейнеров из стекла класса IV – не более 30,0 мл *0,01 М раствора кислоты хлористоводородной* на 10,0 г стекла.

С. Испытание на гидролитическую устойчивость контейнеров с обработанной поверхностью

Количество контейнеров для испытания и объем испытуемой жидкости указаны в таблице 3.2.1.-1.

Методика. Контейнеры промывают дважды *водой Р*, наполняют смесью *кислоты фтористоводородной Р* и *кислоты хлористоводородной Р* и оставляют на 10 мин. Затем контейнеры освобождают от содержимого и тщательно промывают 5 раз *водой Р*. Непосредственно перед испытанием контейнеры еще раз промывают *водой Р*. Подготовленные таким образом контейнеры выдерживают в автоклаве и титруют аналогично тому, как описано для испытания А на поверхностную гидролитическую устойчивость.

Различие между контейнерами из стекла класса I и класса II

Результаты, полученные при проведении испытания С, сравнивают с результатами, полученными при испытании А. Значения указаны в таблице 3.2.1.-3.

Таблица 3.2.1.-3.

Различие между контейнерами из стекла класса I и класса II

Класс I	Класс II
Значения близки к значениям, полученным при проведении испытания на поверхностную гидролитическую устойчивость контейнеров из стекла класса I	Значения значительно превышают значения, полученные при проведении испытания на поверхностную гидролитическую устойчивость и близки к значениям, но не выше их, полученным для контейнеров из стекла класса III

МЫШЬЯК

Испытание проводится для стеклянных контейнеров, предназначенных для водных растворов для парентерального применения.

Оборудование. Аппарат (см. Рисунок 3.2.1.-2) состоит из генератора арсина (*A*), снабженного газоочистительным элементом (*C*) и трубкой поглотителя (*E*) со стандартно-конусными или из притертого стекла шарнирными соединениями (*B* и *D*) между элементами. Можно использовать другой аналогичный аппарат, сконструированный по принципу, описанному выше.

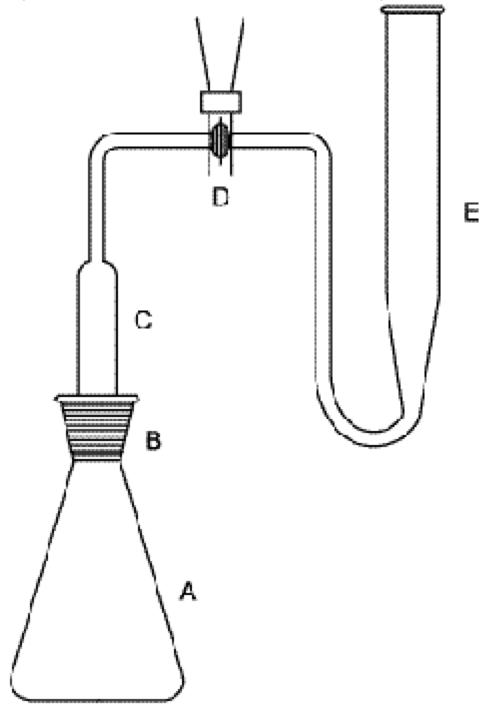


Рисунок 3.2.1.-2. – *Аппарат для определения мышьяка*

Испытуемый раствор. 35 мл жидкости, приготовленной, как указано в испытании А на поверхностную гидролитическую устойчивость, переносят из стеклянного контейнера для стеклянных контейнеров, предназначенных для водных растворов для парентерального применения в колбу генератора. Для контейнеров

меньшего объема, помещают 35 мл смешанного содержимого нескольких контейнеров, подготовленных соответствующим образом.

Раствор сравнения. 3,5 мл *эталонного раствора мышьяка (1 ppm As) Р* доводят до 35 мл *водой Р* и вводят в колбу генератора.

Методика. Поступают с испытуемым раствором и раствором сравнения в одних и тех же условиях следующим образом: в колбе А смешивают 20 мл раствора 350 г/л *кислоты серной Р*, 2 мл раствора *калия йодида Р* , 0,5 мл раствора *олова (II) хлорида Р* и 1 мл *2-пропанола Р*. Оставляют для настаивания в течение 30 мин. Вкладывают в трубку газоочистителя (С) два тампона *свинцово - ацетатной ваты Р* таким образом, чтобы между ватными тампонами оставалось пространство 2 мм. Смазывают соединения (В и D) подходящим маслом и присоединяют газоочистительный элемент к трубке поглотителя (Е). Помещают 3,0 мл раствора 5 г/л *серебра диэтилдитиокарбамата Р* в *безводном пиридине Р* в трубку поглотителя. К смеси в колбе А прибавляют 3,0 г *цинка Р* в гранулах (710), немедленно присоединяют смонтированный газоочистительный элемент. Колбу генератора (А) помещают на водяную баню и выдерживают при температуре (25±3)^{0}С в течение 45 мин, аккуратно поворачивая колбу каждые 10 мин, обеспечивая возможность выделения водорода и появления окрашивания. Отсоединяют трубку поглотителя от генератора и газоочистительного элемента и переносят раствор в трубку для сравнительных испытаний *(2.1.5.)*. Красное окрашивание испытуемого раствора не должно быть более интенсивным, чем окрашивание раствора сравнения. Оценку можно также проводить с помощью спектрофотометра или колориметра, используя раствор серебра диэтилдитиокарбамата в качестве раствора сравнения. Измеряют оптическую плотность раствора в диапазоне длин волн от 535 нм до 540 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. Содержание мышьяка (As) в испытуемом растворе должно быть не более 0,1 ppm.

СВЕТОПРОПУСКАНИЕ ДЛЯ ОКРАШЕННЫХ СВЕТОЗАЩИТНЫХ СТЕКЛЯННЫХ КОНТЕЙНЕРОВ

Приготовление образца. Стеклянный контейнер разбивают или разрезают циркулярной пилой с диском для влажного абразивного шлифования**,** например, карборундовым или металлизированным алмазным диском. Выбирают осколки с соответствующей толщиной стенок и обрезают их таким образом, чтобы они могли быть вставлены в спектрофотометр. Если образец настолько мал, что не может закрыть отверстие для образца в спектрофотометре, то незакрытую часть закрывают непрозрачной бумагой или лентой, обеспечивая, чтобы ширина образца была больше, чем ширина щели. Перед тем, как поместить образец в спектрофотометр, его промывают, высушивают и протирают тканью для протирания линз. Закрепляют образец с помощью воска или другими подходящими способами, аккуратно, чтобы не оставить на образце следов пальцев или других следов.

Методика. Образец помещают в спектрофотометр таким образом, чтобы его цилиндрическая ось была параллельна щели, пучок света шел перпендикулярно поверхности стекла, и потери в результате отражения были минимальны. Измеряют светопропускание образца в сравнении с воздухом в области длин волн от 290 нм до 450 нм непрерывно или с интервалами 20 нм.

Пределы. Светопропускание для контейнеров из окрашенного стекла для лекарственных средств, не предназначенных для парентерального применения, не

должно превышать 10 % при любой длине волны в интервале от 290 нм до 450 нм, независимо от класса и объема стеклянного контейнера. Светопропускание для контейнеров из окрашенного стекла для лекарственных средств, предназначенных для парентерального применения, не должно превышать пределы, указанные в Таблице 3.2.1.-4.

Таблица 3.2.1.-4.

Пределы светопропускания для контейнеров из окрашенного стекла классов I, II и III

Номинальный объем, мл	Максимальное светопропускание (%) при любой длине волны в интервале от 290 нм до 450 нм	
	Контейнеры, герметизированные запаиванием	Контейнеры с пробками
До 1	50	25
От 1 до 2	45	20
От 2 до 5	40	15
От 5 до 10	35	13
От 10 до 20	30	12
Выше 20	15	10

КОНТЕЙНЕРЫ ДЛЯ ЧЕЛОВЕЧЕСКОЙ КРОВИ И ЕЕ КОМПОНЕНТОВ

Термическая устойчивость. Контейнеры не должны разбиваться, трескаться или раскалываться при:

a) помещении пустых контейнеров в автоклав, повышении температуры до 140^{0}С в течение 30 мин и выдерживании их при этой температуре в течение 30 мин;

b) помещении пустых контейнеров в термостат, повышении температуры до 250^{0}С в течение 30 мин и выдерживании их при этой температуре в течение 30 мин;

c) наполнении контейнеров раствором 9 г/л *натрия хлорида Р* на 70 % от максимального объема, указанного на этикетке и постепенном охлаждении на воздухе до температуры -20^{0}С и выдерживании их при этой температуре в течение 24 ч. После повышения температуры до комнатной, контейнеры должны выдерживать испытание на устойчивость к центрифугированию.

d) резком изменении температуры, которое достигается последовательным помещением контейнеров, наполненных водопроводной водой, в две водяные бани с различием температур не менее 40^{0}С.

Устойчивость к центрифугированию. Контейнер наполняют *водой Р* до максимального объема, указанного на этикетке, и помещают его в центрифугу. Уравновешивают центрифугу и центрифугируют со скоростью 2000 оборотов в минуту. Контейнер должен выдерживать данные условия в течение не менее 30 мин.

МАРКИРОВКА

Маркировка контейнеров для человеческой крови и ее компонентов должна производиться в соответствии с действующим национальным законодательством и международными требованиями.

3.2.2. ПЛАСТМАССОВЫЕ КОНТЕЙНЕРЫ И УКУПОРОЧНЫЕ СРЕДСТВА ДЛЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Пластмассовый контейнер для фармацевтического использования – изделие из полимерного материала, который содержит или может содержать фармацевтическую продукцию и находится или может находиться в непосредственном контакте с продукцией. Укупорочное средство является частью контейнера.

Пластмассовые контейнеры и укупорочные средства для фармацевтического использования изготавливают из материалов, которые могут содержать определенные добавки. Такие материалы не могут содержать никаких веществ, которые могли бы экстрагироваться содержимым контейнера в количестве, влияющем на эффективность или стабильность лекарственного средства, или могут быть потенциально опасными в отношении токсичности.

Чаще всего используемыми полимерами являются полиэтилен (содержащий или не содержащий добавок), полипропилен, поливинилхлорид, полиэтилентерефталат и полиэтиленвинилацетат.

Природа и количество добавок определяются типом полимера, технологией переработки полимера в контейнер и предполагаемой целью применения. Добавки могут включать антиоксиданты, стабилизаторы, пластификаторы, смазки, красители и модификаторы ударостойкости. Антистатики и вещества, облегчающие вынимание из формы, могут быть использованы только в составе полимеров для изготовления контейнеров, предназначенных для лекарственных средств для перорального или наружного применения, для которых разрешено их использование. Допустимые добавки обозначаются в типовой спецификации на каждый материал, описанный в Фармакопее. Другие добавки можно использовать с условием, что они в каждом конкретном случае разрешены компетентным уполномоченным органом.

Чтобы оценить потенциальный риск при выборе соответствующего пластмассового контейнера, следует знать полный состав пластичного материала при его производстве, включая все материалы, используемые в процессе формования контейнера. Пластмассовый контейнер, выбранный для какого-либо конкретного лекарственного средства, должен соответствовать таким требованиям:

- компоненты лекарственного средства, которые находятся в контакте с пластичным материалом, не должны значительно адсорбироваться его поверхностью и мигрировать внутрь пластика или через него,
- пластичный материал не должен выделять в содержимое контейнера никаких веществ в таком количестве, которое влияет на эффективность или стабильность лекарственного средства или может быть потенциально опасным относительно токсичности.

Используя материал или материалы, выбранные в соответствии с этими критериями, изготовляют некоторое количество идентичных образцов контейнеров, используя хорошо отработанную методику, и подвергают их практичным испытаниям в условиях, соответствующих условиям их предполагаемого применения, включая, если необходимо, стерилизацию. Для того, чтобы подтвердить совместимость контейнера и его содержимого и убедиться в отсутствии изменений, негативно влияющих на качество лекарственного средства, проводят разные испытания, такие как контроль отсутствия изменений физических характеристик, оценка каких-либо потерь или прироста содержимого контейнера, благодаря про-

никновению, определение изменений pH, оценка изменений, вызванных влиянием света, химические испытания и, если необходимо, биологические испытания.

Метод производства должен обеспечивать возможность его воспроизводства для дальнейшего производства в больших объемах, а условия производства подбираются таким образом, чтобы избежать возможности загрязнения другими пластичными материалами или их ингредиентами. Производитель продукта обязан гарантировать, что контейнеры, которые изготавливаются в условиях производства, по всем показателям идентичны типовым образцам.

Для того, чтобы результаты испытаний типовых образцов считались достоверными, важно, чтобы:

- не было изменений в составе материала, описанного для типовых образцов,
- не было изменений в производственном процессе, описанном для типовых образцов, особенно относительно температуры в процессе переработки материала или в ходе последующих процедур, таких как стерилизация,
- не использовался материал из отходов или брака.

Повторная переработка излишка материала, природа и состав которого хорошо известны, может быть разрешена после соответствующей валидации.

После проведения испытания на совместимость с положительными результатами для каждой комбинации контейнера и содержимого материал, описанный в Фармакопее, признают соответствующим для специальных целей, описанных выше.

3.2.2.1. ПЛАСТМАССОВЫЕ КОНТЕЙНЕРЫ ДЛЯ ВОДНЫХ РАСТВОРОВ ДЛЯ ПАРЕНТЕРАЛЬНОГО ПРИМЕНЕНИЯ

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Пластмассовые контейнеры для водных растворов для парентерального применения изготавливают из одного или нескольких полимеров, которые, если необходимо, содержат добавки. Контейнеры, описанные в данном разделе, не обязательно пригодны для эмульсий. Наиболее часто используемыми полимерами являются полиэтилен, полипропилен и поливинилхлорид. Спецификации, приведенные в данном разделе, следует использовать вместе с разделом *3.2.2. Пластмассовые контейнеры и укупорочные средства для фармацевтического применения.*

Контейнеры могут представлять собой пакеты или флаконы. Они имеют приспособление для присоединения комплекта для вливания, сконструированное таким образом, чтобы обеспечить надежное соединение. Они могут иметь приспособление, позволяющее проводить инъекцию во время использования. Контейнеры обычно снабжены элементом, обеспечивающим возможность подвешивания, стойким к растягиванию, которое возникает во время использования. Контейнеры должны выдерживать условия стерилизации. Конструкция контейнера и выбранный метод стерилизации должны быть такими, чтобы обеспечить возможность стерилизации всех элементов контейнера, находящихся в контакте с раствором для вливания. Контейнеры после закупоривания должны быть непроницаемыми для микроорганизмов и после наполнения должны быть стойкими к повреждени-

ям, обусловленным непредвиденным замораживанием, которое может произойти при транспортировании готового лекарственного средства. Контейнеры должны быть прозрачными для того, чтобы обеспечить возможность визуального осмотра содержимого в любой момент, если нет других предписаний.

Пустые контейнеры не должны иметь дефектов, которые могли бы привести к просачиванию, наполненные и закрытые контейнеры не должны проявлять признаков просачивания.

Для соответствующего сохранения некоторых лекарственных средств контейнер следует упаковывать в защитную упаковку. В этом случае первичную оценку сохранности проводят, используя контейнер в упаковке.

ИСПЫТАНИЯ

Раствор S. *Раствор S используют в течение 4 ч после приготовления*. Контейнер наполняют *водой Р* до номинального объема и укупоривают его, по возможности используя обычные укупорочные средства; можно закрыть контейнер фольгой алюминиевой. Нагревают контейнер в автоклаве таким образом, чтобы за 20-30 мин температура достигла (121±2)^{0}С, и выдерживают при этой температуре в течение 30 мин. Если нагревание при температуре 121^{0}С ведет к разрушению контейнера, нагревание ведут при температуре 100^{0}С в течение 2 ч.

Контрольный раствор. Параллельно с раствором S готовят контрольный раствор, используя *воду Р* и колбу из боросиликатного стекла, закрытую фольгой алюминиевой.

Внешний вид раствора S. Раствор S должен быть прозрачным (*2.2.1*) и бесцветным (*2.2.2, Метод II*).

Кислотность или щелочность. К объему раствора S, соответствующему 4% номинального объема контейнера, прибавляют 0,1 мл *раствора фенолфталеина Р*. Раствор должен быть бесцветным. Для изменения окраски раствора на розовую должно потребоваться 0,4 мл *0,01 М раствора натрия гидроксида*. Прибавляют 0,8 мл *0,01 М раствора кислоты хлористоводородной* и *0,1 мл раствора метилового красного Р*. Окрашивание раствора должно измениться до оранжево-красного или красного.

Оптическая плотность (*2.2.25*). Измеряют оптическую плотность раствора S в области от 230 нм до 360 нм, используя контрольный раствор в качестве раствора сравнения (см. раствор S). Оптическая плотность не должна превышать 0,20.

Восстановители. К 20,0 мл раствора S прибавляют 1 мл *кислоты серной разведенной Р* и 20,0 мл *0,002 М раствора калия перманганата*. Кипятят с обратным холодильником в течение 3 мин и сразу охлаждают. К полученному раствору прибавляют 1 г *калия иодида Р* и немедленно титруют *0,01 М раствором натрия тиосульфата*, используя в качестве индикатора 0,25 мл *раствора крахмала Р*. Параллельно проводят контрольный опыт, используя 20,0 мл контрольного раствора. Разность между объемами титранта не должна превышать 1,5 мл.

Прозрачность. Контейнер, предварительно использованный для приготовления раствора S, наполняют суспензией с первичной мутностью (*2.2.1*), разведенной в соотношении 1:200 для контейнеров, изготовленных из полиэтилена или полипропилена, и 1:400 для других контейнеров, в количестве, равном номинальному объему контейнера. При просмотре через контейнер и в сравнении с контейнером, наполненным *водой Р*, должно быть заметно помутнение.

МАРКИРОВКА

Маркировка партии пустых контейнеров содержит:
- наименование и адрес изготовителя,
- номер серии, который позволяет проследить историю контейнера и полимерного материала, из которого он изготовлен.

3.2.3. СТЕРИЛЬНЫЕ ПЛАСТМАССОВЫЕ КОНТЕЙНЕРЫ ДЛЯ ЧЕЛОВЕЧЕСКОЙ КРОВИ И ЕЕ КОМПОНЕНТОВ

Пластмассовые контейнеры для сбора, хранения, обработки и переливания крови и ее компонентов производят из одного или нескольких полимеров, если необходимо, с использованием добавок. Состав и условия производства контейнеров регламентируются соответствующими компетентными органами в соответствии с действующим национальным законодательством и международными требованиями.

Если состав материалов разных частей контейнера соответствует конкретным спецификациям, их качество контролируется методами, описанными в данных спецификациях (см. раздел *3.1. «Материалы, используемые для производства контейнеров»* и его подразделы).

Материалы, отличные от тех, что описаны в Фармакопее, могут быть использованы для производства контейнеров в том случае, если их состав утвержден компетентным уполномоченным органом, а также, если полученные контейнеры отвечают требованиям для стерильных пластмассовых контейнеров для человеческой крови и ее компонентов.

В нормальных условиях при использовании материалы не должны выделять мономеры или другие вещества в количествах, вредных для человека или вызывающих аномальные изменения крови.

Контейнеры могут содержать растворы антикоагулянтов в зависимости от их предполагаемого использования и должны быть стерильными.

Каждый контейнер снабжается приспособлениями в зависимости от его предполагаемого использования. Контейнер может быть в виде одного элемента. Контейнер для отбора крови может быть соединен одной или несколькими трубками к другому (одному или нескольким контейнерам) для разделения компонентов крови в закрытой системе.

Форма и размер выходного отверстия должны обеспечивать соединение контейнера с устройством для подачи крови. Защитное покрытие иглы для отбора

крови и дополнительных элементов должно обеспечивать сохранение стерильности. Они должны легко отсоединяться и иметь контроль первого вскрытия.

Емкость контейнеров связана с номинальным объемом, который установлен соответствующим национальным органом в соответствии с объемом раствора антикоагулянта. Номинальный объем – это объем крови, который следует собрать в контейнер. Контейнеры должны иметь такую форму, чтобы после их наполнения обеспечить возможность центрифугирования.

Контейнеры должны быть обеспечены соответствующим приспособлением для подвешивания и фиксации, которое не должно быть помехой для отбора, хранения, обработки и переливания крови.

Контейнеры должны быть упакованы в герметичную защитную упаковку.

ОПИСАНИЕ

Контейнер должен быть достаточно прозрачным для визуального контроля содержимого до и после отбора крови и достаточно эластичным для обеспечения минимального сопротивления в процессе наполнения и опустошения от содержимого в нормальных условиях. Наполненный контейнер может содержать не более 5 мл воздуха.

ИСПЫТАНИЯ

Раствор S1. Наполняют контейнер 100 мл стерильного, свободного от пирогенных веществ раствора 9 г/л *натрия хлорида Р*. Закрывают и нагревают в автоклаве таким образом, чтобы температура содержимого поддерживалась на уровне 110^{0}С в течение 30 мин.

Если испытуемый контейнер содержит раствор антикоагулянта, содержимое удаляют, промывают контейнер 250 мл *воды для инъекций Р* при температуре (20±1)^{0}С и сливают промывную жидкость.

Раствор S2. Количество *воды для инъекций Р*, соответствующее предполагаемому объему раствора антикоагулянта, помещают в контейнер. Закрывают контейнер и нагревают в автоклаве таким образом, чтобы температура содержимого поддерживалась на уровне 110^{0}С в течение 30 мин. После охлаждения добавляют *воду для инъекций Р* до номинального объема контейнера.

Если испытуемый контейнер содержит раствор антикоагулянта, содержимое удаляют и обрабатывают его, как описано выше.

Устойчивость к центрифугированию. Помещают в контейнер количество *воды Р*, подкисленной 1 мл *кислоты хлористоводородной разведенной Р*, соответствующее его номинальному объему. Заворачивают контейнер в абсорбирующую бумагу, пропитанную разведенным в соотношении 1:5 *раствором бромфенолового синего Р1* или другим подходящим индикатором, и высушенную. Центрифугируют со скоростью 5000 об/мин в течение 10 мин. Не должно наблюдаться протекания раствора на индикаторную бумагу, а также каких-либо изменений формы контейнера.

Устойчивость к растяжению. Помещают в контейнер количество *воды Р*, подкисленной 1 мл *кислоты хлористоводородной разведенной Р*, соответствующее его номинальному объему. Подвешивают контейнер с помощью приспособления для подвешивания за конец, противоположный трубке для отбора крови и вдоль оси трубки добавляют усилие в 20 Н (2,05 кгс). Поддерживают усилие растяжения в течение 5 с. Повторяют испытание, добавляя усилие к каждому элементу контейнера для наполнения и опустошения контейнера. Не должно происходить разрывов и других повреждений контейнера.

Герметичность. Контейнер, который прошел испытание на устойчивость к растяжению, помещают между двумя пластинами, покрытыми абсорбирующей бумагой, пропитанной разведенным в соотношении 1:5 *раствором бромфенолового синего Р1* или другим подходящим индикатором, и высушенной. Постепенно прикладывают усилие к пластинам для сжатия контейнера таким образом, чтобы его внутреннее давление (т.е. разность между приложенным и атмосферным давлением) достигло 67 кПа в течение 1 мин. Поддерживают давление на этом уровне в течение 10 мин. На индикаторной бумаге, а также в любой из точек присоединения элементов не должно наблюдаться следов протекания.

Проницаемость для паров. Если контейнер содержит раствор антикоагулянта, наполняют его раствором 9 г/л *натрия хлорида Р* в объеме, равном объему крови, для которого он предназначен.

Если контейнер пустой, то его наполняют соответствующим количеством смеси раствора антикоагулянта и раствора натрия хлорида. Закрывают контейнер, взвешивают его и оставляют при температуре (5±1)^{0}С в атмосфере с относительной влажностью (50±5) % в течение 21 дня. По окончании этого периода потеря в массе не должна превышать 1 %.

Удаление содержимого под давлением. Наполняют контейнер *водой Р* при температуре (5±1)^{0}С в количестве, равном его номинальному объему. Присоединяют приспособление для переливания крови без внутривенной канюли к одному из элементов. Сжимают контейнер таким образом, чтобы внутреннее давление (т.е. разность между приложенным и атмосферным давлением) при удалении его содержимого достигло 40 кПа. Контейнер должен освобождаться от содержимого в течение не более 2 мин.

Скорость наполнения. С помощью трубки для отбора крови (снабженной иглой) присоединяют контейнер к резервуару, содержащему раствор, вязкость которого соответствует вязкости крови, например, раствор 335 г/л *сахарозы Р* с температурой 37^{0}С. Поддерживают внутреннее давление в резервуаре (т.е. разность между приложенным и атмосферным давлением) на уровне 9,3 кПа, при этом основа резервуара и верхняя часть контейнера должны находиться на одном уровне. Объем жидкости, который набирается в контейнер в течение 8 мин, не должен быть меньше номинального объема контейнера.

Устойчивость к колебанию температуры. Контейнер помещают в камеру с температурой от 20^{0}С до 23^{0}С. Быстро охлаждают с глубоким замораживанием до температуры -80^{0}С и выдерживают при этой температуре в течение 24 ч. Поднимают температуру до 50^{0}С и выдерживают в течение 12 ч. Охлаждают до комнатной температуры. Контейнер должен выдерживать испытания на устойчивость к центрифугированию, устойчивость к растяжению, герметичность, проницаемость

для паров, удаление содержимого под давлением и скорость наполнения, описанные выше.

Прозрачность. Контейнер наполняют до номинального объема суспензией с первичной мутностью *(2.2.1)*, разбавленной таким образом, чтобы оптическая плотность *(2.2.25)* при длине волны 640 нм составляла от 0,37 до 0,43 (фактор разведения около 1:16). Мутность суспензии должна быть сравнима с мутностью *воды Р* при наполнении идентичного контейнера.

Экстрагируемые вещества. Испытания проводят такими методами, чтобы контакт между контейнером и его содержимым как можно ближе соответствовал их контакту в реальных условиях использования контейнера.

Условия контакта, а также испытания, которые следует выполнять для элюатов, описаны, в зависимости от природы материала, в требованиях к конкретному классу контейнера.

Гемолитические эффекты в буферных системах

Основной буферный раствор. Растворяют 90,0 г *натрия хлорида Р*, 34,6 г *натрия гидрофосфата Р* и 2,43 г *натрия дигидрофосфата Р* в *воде Р* и доводят объем раствора тем же растворителем до 1000 мл.

Буферный раствор A_0. К 30,0 мл основного буферного раствора прибавляют 10,0 мл *воды Р*.

Буферный раствор B_0. К 30,0 мл основного буферного раствора прибавляют 20,0 мл *воды Р*.

Буферный раствор C_0. К 15,0 мл основного буферного раствора прибавляют 85,0 мл *воды Р*.

Помещают 1,4 мл раствора S2 в каждую из трех пробирок центрифуги. В пробирку I прибавляют 0,1 мл буферного раствора A_0, в пробирку II – 0,1 мл буферного раствора B_0, в пробирку III – 0,1 мл буферного раствора C_0. В каждую из пробирок добавляют 0,02 мл свежей гепаринизированной человеческой крови, тщательно перемешивают и нагревают на водяной бане при температуре $(30\pm1)^0$C в течение 40 мин. Используют кровь, отобранную менее чем за 3 ч или кровь, отобранную в раствор антикоагулянта – раствор цитрат – фосфат – декстрозы (ЦФД) - менее чем за 24 ч до проведения испытания.

Готовят три раствора, содержащих соответственно:
3,0 мл буферного раствора A_0 и 12,0 мл *воды Р* (раствор A_1),
4,0 мл буферного раствора B_0 и 11,0 мл *воды Р* (раствор B_1),
4,75 мл буферного раствора C_0 и 10,25 мл *воды Р* (раствор C_1).

В пробирки центрифуги I, II, III прибавляют соответственно 1,5 мл раствора A_1, 1,5 мл раствора B_1 и 1,5 мл раствора C_1. Параллельно готовят три другие пробирки центрифуги, заменяя раствор S2 *водой Р*. Центрифугируют одновременно пробирки с испытуемым и контрольным растворами в горизонтальной центрифуге со скоростью 2500 об/мин в течение 5 мин. После центрифугирования измеряют оптическую плотность *(2.2.25)* растворов при длине волны 540 нм, используя в ка-

честве раствора сравнения основной буферный раствор. Гемолитическое число (%) вычисляют по формуле:

$$\frac{A_{exp}}{A_{100}} \times 100$$

где:

A_{100} - оптическая плотность раствора из пробирки III,

A_{exp} - оптическая плотность раствора из пробирки I или II или соответствующих контрольных растворов.

Гемолитическое число раствора из пробирки I должно быть не более 10 %, а гемолитическое число раствора из пробирки II не должно отличаться более, чем на 10 % от соответствующего контрольного раствора.

Стерильность *(2.6.1)*. Контейнеры должны выдерживать испытание на стерильность. В асептических условиях помещают в контейнер 100 мл стерильного раствора 9 г/л *натрия хлорида Р* и встряхивают контейнер до тех пор, пока его внутренняя стенка не будет полностью смочена. Фильтруют содержимое контейнера через мембранный фильтр, а затем помещают мембрану в соответствующую питательную среду, как описано в испытании на стерильность.

Пирогенные вещества *(2.6.8)*. Раствор S1 должен выдерживать испытание на пирогенность. На 1 кг массы кролика вводят 10 мл раствора.

Аномальная токсичность *(2.6.9)*. Раствор S1 должен выдерживать испытание на аномальную токсичность. Каждой мыши вводят 0,5 мл раствора.

УПАКОВКА

Контейнеры упаковывают в защитную упаковку.

При удалении контейнера из упаковки не должно наблюдаться протекание и рост микроорганизмов. Защитная оболочка должна быть достаточно крепкой, чтобы выдерживать хранение в обычных условиях.

Защитная оболочка должна быть такой, чтобы ее невозможно было открыть и повторно закрыть без видимых следов.

МАРКИРОВКА

Маркировка контейнеров должна соответствовать требованиям национального законодательства и международным требованиям. На этикетке указывают:

- наименование и адрес производителя,
- номер серии, который позволяет проследить историю контейнера и полимерного материала, из которого он был изготовлен.

Часть этикетки оставляют незаполненной для:

- указания группы крови, номера поставки и другой информации в соответствии с национальным законодательством и международными требованиями, а также свободное место для дополнительной информации.

На этикетке защитной упаковки или этикетке контейнера, видимой сквозь оболочку, указывают:

- дату истечения срока годности,

- «После удаления из защитной оболочки контейнер необходимо использовать в течение 10 дней».

Чернила или другие вещества, используемые для печати этикеток, не должны проникать в материал контейнера, надписи должны быть четкими в течение всего времени использования контейнера.

3.2.4. ПУСТЫЕ СТЕРИЛЬНЫЕ КОНТЕЙНЕРЫ ИЗ ПЛАСТИФИЦИРОВАННОГО ПОЛИВИНИЛХЛОРИДА ДЛЯ ЧЕЛОВЕЧЕСКОЙ КРОВИ И ЕЕ КОМПОНЕНТОВ

Если нет других указаний в соответствии со статьей «*Стерильные пластмассовые контейнеры для человеческой крови и компонентов крови*» (*3.2.3.*), природа и состав материалов, из которых изготавливают контейнеры, должны соответствовать требованиям статьи «*Материалы для контейнеров для человеческой крови и компонентов крови*» (*3.1.1*).

ИСПЫТАНИЯ

Контейнеры должны выдерживать испытания, обозначенные в статье «*Стерильные пластмассовые контейнеры для человеческой крови и компонентов крови*» (*3.2.3*), а также следующие испытания для определения экстрагируемых веществ.

Раствор сравнения. *Воду для инъекций Р* нагревают в колбе из боросиликатного стекла в автоклаве при температуре 110^{0}С в течение 30 мин.

Окислители. Свежеприготовленный раствор S2 (*3.2.3*) помещают в колбу из боросиликатного стекла в количестве, соответствующем 8% от номинального объема контейнера. Одновременно с испытуемым раствором в другой колбе из боросиликатного стекла готовят контрольный раствор, используя такой же объем свежеприготовленного раствора сравнения. К каждому раствору прибавляют по 20,0 мл *0,002 М раствора калия перманганата* и 1 мл *кислоты серной разведенной Р*. Выдерживают в защищенном от света месте в течение 15 мин. К каждому раствору прибавляют 0,1 г *калия йодида Р*. Выдерживают в защищенном от света месте в течение 5 мин и немедленно титруют *0,01 М раствором натрия тиосульфата*, используя в качестве индикатора 0,25 мл *раствора крахмала Р.* Разность между объемами титранта не должна превышать 2,0 мл.

Кислотность или щелочность. К объему раствора S2, соответствующего 4% номинального объема контейнера, прибавляют 0,1 мл *раствора фенолфталеина Р*. Раствор должен быть бесцветным. Для изменения окраски раствора на розовую должно потребоваться 0,4 мл *0,01 М раствора натрия гидроксида*. Прибавляют 0,8 мл *0,01 М раствора кислоты хлористоводородной* и *0,1 мл раствора метилового красного Р*. Окрашивание раствора может измениться до оранжево-красного или красного.

Хлориды (*2.4.4*).15 мл раствора S2 должны выдерживать испытания на хлориды (0,4 ppm). Эталонный раствор готовят с использованием 1,2 мл *эталонного раствора хлорида (5 ppm Cl) Р* и 13,8 мл *воды Р.*

Аммоний *(2.4.1)*. 5 мл раствора S2 доводят *водой Р* до объема 14 мл. Раствор должен выдерживать испытания на аммоний (2 ppm).

Сухой остаток. 100 мл раствора S2, предварительно подогретого до температуры 105^{0}С, выпаривают досуха в стакане из боросиликатного стекла необходимой вместимости. 100 мл раствора сравнения выпаривают досуха в тех же условиях (контрольный опыт). Сушат до постоянной массы при температуре от 100^{0}С до 105^{0}С. Масса остатка от раствора S2 не должна превышать 3 мг с учетом контрольного опыта.

Оптическая плотность *(2.2.25)*. Измеряют оптическую плотность раствора S2 в области от 230 нм до 360 нм относительно раствора сравнения. Оптическая плотность в области от 230 нм до 250 нм не должна превышать 0,30 и в области от 251 нм до 360 нм не должна превышать 0,10.

Экстрагируемый ди(2-этилгексил)фталат. В качестве экстрагента используют *спирт Р*, разбавленный *водой Р* до получения относительной плотности (*2.2.5*) от 0,9389 до 0,9395, определенной с помощью пикнометра.

Основной раствор. 0,100 г *ди(2-этилгексил)фталата Р* растворяют в экстрагенте и доводят объем раствора тем же растворителем до 100,0 мл.

Эталонные растворы:
(a) 20,0 мл основного раствора доводят экстрагентом до объема 100,0 мл.
(b) 10,0 мл основного раствора доводят экстрагентом до объема 100,0 мл.
(c) 5,0 мл основного раствора доводят экстрагентом до объема 100,0 мл.
(d) 2,0 мл основного раствора доводят экстрагентом до объема 100,0 мл.
(e) 1,0 мл основного раствора доводят экстрагентом до объема 100,0 мл.

Измеряют оптическую плотность (*2.2.25*) эталонных растворов в максимуме при длине волны 272 нм, используя экстрагент в качестве раствора сравнения, и строят кривую зависимости оптической плотности от концентрации ди(2-этилгексил)фталата.

Методика экстракции. Контейнер наполняют экстрагентом, используя донорскую трубку и иглу или адаптер. Объем экстрагента, предварительно подогретого до температуры 37^{0}С в плотно закупоренной колбе, составляет половину номинального объема контейнера. Полностью удаляют воздух из контейнера и герметично закрывают донорскую трубку. Заполненный контейнер опускают в горизонтальном положении в водяную баню, в которой поддерживают температуру (37±1)^{0}С в течение (60±1) мин, не встряхивая. Вынимают контейнер из водяной бани, аккуратно переворачивают его десять раз, потом переносят содержимое в стеклянную колбу. Сразу же измеряют оптическую плотность в максимуме при длине волны 272 нм, используя экстрагент в качестве раствора сравнения.

Определяют содержание ди(2-этилгексил)фталата в миллиграммах на 100 мл экстракта, используя градуировочный график. Содержание не должно превышать:

- 10 мг на 100 мл для контейнеров с номинальным объемом от 300 мл до 500 мл;
- 13 мг на 100 мл для контейнеров с номинальным объемом от 150 мл до 300 мл;

- 14 мг на 100 мл для контейнеров с номинальным объемом до 150 мл.

УПАКОВКА

Как обозначено в разделе «*Стерильные пластмассовые контейнеры для человеческой крови и компонентов крови*» (*3.2.3*).

МАРКИРОВКА

Как обозначено в разделе «*Стерильные пластмассовые контейнеры для человеческой крови и компонентов крови*» (*3.2.3*).

3.2.5. СТЕРИЛЬНЫЕ КОНТЕЙНЕРЫ ИЗ ПЛАСТИФИЦИРОВАННОГО ПОЛИВИНИЛХЛОРИДА ДЛЯ ЧЕЛОВЕЧЕСКОЙ КРОВИ, СОДЕРЖАЩИЕ РАСТВОР АНТИКОАГУЛЯНТА

Стерильные пластмассовые контейнеры, содержащие раствор антикоагулянта, которые соответствуют требованиям раздела «*Растворы антикоагулянтов и консервантов для человеческой крови (0209)*», используют для сбора, хранения и введения крови. Перед наполнением они должны соответствовать описанию и характеристикам, приведенным в разделе «*Пустые стерильные контейнеры из пластифицированного поливинилхлорида для человеческой крови и компонентов крови*» (*3.2.4*).

Если нет других указаний в соответствии со статьей «*Стерильные пластмассовые контейнеры для человеческой крови и компонентов крови*» (*3.2.3.*), природа и состав материалов, из которых изготавливают контейнеры, должны соответствовать требованиям статьи «*Материалы для контейнеров для человеческой крови и компонентов крови» (3.1.1).*

ИСПЫТАНИЯ

Контейнеры должны выдерживать испытания, обозначенные в статье «*Стерильные пластмассовые контейнеры для человеческой крови и компонентов крови*» (*3.2.3*), а также следующие испытания – определение объема раствора антикоагулянта и определение экстрагируемых веществ.

Объем раствора антикоагулянта. Раствор антикоагулянта переносят из контейнера в градуированный цилиндр. Объем не должен отличаться от обозначенного на этикетке более чем на ±10%.

Спектрофотометрическое определение *(2.2.25)*. Измеряют оптическую плотность раствора антикоагулянта из контейнера в области длин волн от 250 нм до 350 нм, используя раствор антикоагулянта того же состава, который не был в контакте с пластическим материалом, в качестве раствора сравнения. Оптическая плотность в максимуме при длине волны 280 нм не должна превышать 0,5.

Экстрагируемый ди(2-этилгексил)фталат. Раствор антикоагулянта аккуратно удаляют из контейнера с помощью гибкой соединительной трубки. Используя воронку, соединенную с трубкой, наполняют контейнер *водой Р*, оставляют в контакте в течение 1 мин, аккуратно сдавливая контейнер, потом полностью освобождают от содержимого. Повторяют промывание.

Контейнер, освобожденный от содержимого и промытый таким образом, должен выдерживать испытания на экстрагируемый ди(2-этилгексил)фталат, обозначенные в разделе «*Пустые стерильные пластмассовые контейнеры из пластифицированного поливинилхлорида для человеческой крови и компонентов крови*» (*3.2.4*).

УПАКОВКА И МАРКИРОВКА

Как обозначено в разделе «*Стерильные пластмассовые контейнеры для человеческой крови и компонентов крови*» (*3.2.3*).

3.2.6. КОМПЛЕКТЫ ДЛЯ ПЕРЕЛИВАНИЯ КРОВИ И КОМПОНЕНТОВ КРОВИ

Комплекты для переливания крови и компонентов крови состоят, обычно, из пластмассовой трубки, к которой присоединены остальные элементы, необходимые для использования комплекта для переливания крови надлежащим образом. Комплекты включают в себя приспособление для прокалывания пробки, фильтр для крови, капельницу, регулятор потока, соединительный элемент Luer и, как правило, приспособление для инъекций во время переливания. Если комплекты предназначены для использования с контейнерами, для которых необходим воздушный фильтр, его можно включить в приспособление для прокалывания пробки или можно использовать другое приспособление для введения воздуха. Камера, включающая фильтр для крови, капельница и основная трубка должны быть прозрачными. Используемые материалы и модель комплекта для переливания выбирают так, чтобы исключить гемолитические эффекты. Комплекты должны соответствовать действующим на данный момент стандартам размеров и эксплуатационных характеристик.

Все части комплекта, которые могут находиться в контакте с кровью и ее компонентами, должны быть стерильными и свободными от пирогенных веществ. Каждый комплект помещается в индивидуальную упаковку, которая обеспечивает стерильность содержимого. Комплекты нельзя стерилизовать или использовать повторно.

Комплекты для переливания крови и ее компонентов должны быть изготовлены в соответствии с требованиями надлежащей производственной практики для медицинского оборудования, а также требованиями соответствующих национальных регламентирующих документов.

ИСПЫТАНИЯ

Испытания проводятся на стерильных комплектах.

Раствор S. Готовят замкнутую циркуляционную систему из трех комплектов и сосуда из боросиликатного стекла вместимостью 300 мл. Присоединяют к сосуду термостат, который поддерживает температуру жидкости в сосуде на уровне (37±1)^{0}С. Пропускают через систему в направлении переливания 250 мл *воды для инъекций Р* в течение 2 ч со скоростью 1 л/ч (например, с помощью перистальти-

ческого насоса, присоединенного к максимально меньшему участку силиконовой трубки). Собирают весь раствор и охлаждают.

Внешний вид раствора S. Раствор S должен быть прозрачным *(2.2.1)* и бесцветным *(2.2.2., Метод II)*.

Кислотность или щелочность. К 25 мл раствора S прибавляют 0,15 мл *раствора BRP индикатора Р*. Для изменения окраски раствора на синюю должно потребоваться не более 0,5 мл *0,01 М раствора натрия гидроксида*. К 25 мл раствора S прибавляют 0,2 мл *раствора метилового оранжевого Р*. Для изменения окраски раствора должно потребоваться не более 0,5 мл *0,01 М раствора кислоты хлористоводородной*.

Оптическая плотность *(2.2.25)*. Оптическая плотность раствора S в диапазоне длин волн от 230 нм до 250 нм не должна превышать 0,30. В диапазоне длин волн от 251 нм до 360 нм - не должна превышать 0,15.

Этиленоксид. Если на этикетке указано, что для стерилизации использовался этиленоксид, то его содержание, определенное нижеописанным методом, не должно превышать 10 ppm. Определение проводят методом газовой хроматографии *(2.2.28)*.

Условия хроматографирования:

- колонка из нержавеющей стали длиной 1,5 м, с внутренним диаметром 6,4 мм, заполненная сорбентом *диатомит силанизированный для газовой хроматографии Р,* импрегнированным *макроголем 1500 Р* (3 г на 10 г),
- газ–носитель – *гелий для хроматографии Р*; скорость газа–носителя – 20 мл/мин;
- детектор пламенно-ионизационный;
- температура колонки – 40^0С;
- температура блока ввода проб – 100^0С;
- температура детектора – 150^0С.

Проверяют отсутствие пиков, выходящих одновременно с пиком этиленоксида, проводя в следующих условиях хроматографирования испытание на нестерильных комплектах:

- колонка из нержавеющей стали длиной 3 м, с внутренним диаметром 3,2 мм, заполненная сорбентом *диатомит силанизированный для газовой хроматографии Р,* импрегнированным *трисцианоэтоксипропаном Р* (2 г на 10 г),
- газ–носитель – *гелий для хроматографии Р*; скорость газа–носителя – 20 мл/мин;
- детектор пламенно-ионизационный;
- температура колонки – 60^0С;
- температура блока ввода проб – 100^0С;
- температура детектора – 150^0С.

Раствор этиленоксида. Готовят в вытяжном шкафу. Во флакон вместимостью 50 мл помещают 50,0 мл *диметилацетамида Р*, укупоривают, закрепляют пробку и взвешивают с точностью до 0,1 мг. Полиэтиленовый или полипропиленовый шприц вместимостью 50 мл наполняют газообразным *этиленоксидом Р*, оставляют газ в контакте со шприцем в течение 3 мин, освобождают шприц от содержимого и снова наполняют его 50 мл газообразного *этиленоксида Р*. Присое-

диняют к шприцу гиподермальную иглу и уменьшают объем газа в шприце от 50 мл до 25 мл. Медленно вводят эти 25 мл во флакон, аккуратно встряхивая и предотвращая контакт между иглой и жидкостью. Снова взвешивают флакон: увеличение массы должно составлять от 45 мг до 60 мг, эта величина используется для расчета точной концентрации раствора (около 1 г/л).

Испытание. После удаления упаковки взвешивают комплект. Разрезают его на части с максимальным размером сторон 1 см и помещают во флакон вместимостью от 250 мл до 500 мл, содержащий 150 мл *диметилацетамида Р*. Укупоривают флакон и закрепляют пробку. Помещают флакон в сушильный шкаф с температурой (70±1)^{0}С на 16 ч. Отбирают из флакона 1 мл горячего газа и вводят в колонку. Содержание этиленоксида вычисляют, используя градуировочный график по высоте полученных пиков.

Градуировочный график. В серию из семи флаконов аналогичных флакону для испытания, содержащих по 150 мл *диметилацетамида Р*, помещают 0 мл, 0,05 мл, 0,10 м, 0,20 мл, 0,50 мл, 1,00 мл и 2,00 мл раствора этиленоксида соответственно. Полученные таким образом растворы содержат 0 мкг, 50 мкг, 100 мкг, 200 мкг, 500 мкг, 1000 мкг и 2000 мкг этиленоксида. Флаконы укупоривают, закрепляют пробки и помещают в сушильный шкаф при температуре (70±1)^{0}С на 16 ч. Отбирают из каждого флакона по 1 мл горячего газа, вводят в колонку, по высоте полученных пиков и содержанию этиленоксида в каждом флаконе строят градуировочный график.

Восстановители. *Испытание проводят в течение 4 ч после приготовления раствора S.* К 20,0 мл раствора S прибавляют 1 мл *кислоты серной разведенной Р* и 20,0 мл *0,002 М раствора калия перманганата*. Кипятят в течение 3 мин и сразу охлаждают. Прибавляют 1 г *калия иодида Р* и титруют *0,01 М раствором натрия тиосульфата*, используя в качестве индикатора 0,25 мл *раствора крахмала Р*. Параллельно проводят контрольный опыт, используя 20 мл *воды для инъекций Р.* Разность между объемами титранта не должна превышать 2,0 мл.

Посторонние вещества. Через входное отверстие наполняют контейнер раствором 0,1 г/л *натрия лаурилсульфата Р*, предварительно профильтрованным через стеклянный фильтр (16) и нагретым до температуры 37^{0}С. Собирают жидкость, вытекающую из выходного отверстия. При просматривании в соответствующих условиях жидкость должна быть прозрачной и свободной от каких-либо видимых частиц или волокон (предполагается, что частицы и волокна диаметром 50 мкм и более видны невооруженным глазом).

Скорость потока. Через полный комплект с полностью открытым регулятором потока пропускают 50 мл раствора с вязкостью 3 мПа·с (3 сП) (например, раствор 33 г/л *макроголя 4000 Р* при температуре 20^{0}С) под гидростатическим давлением, соответствующим 1 м. Время, необходимое для протекания 50 мл раствора, не должно превышать 90 с.

Устойчивость к сжатию. Герметизируют концы комплекта и все входные отверстия для воздуха. Присоединяют комплект к выходному отверстию для сжатого воздуха, снабженного регулятором давления. Помещают контейнер в резервуар с водой при температуре от 20^{0}С до 23^{0}С. Постепенно подают избыточное давление величиной 100 кПа и выдерживают в течение 1 мин. Из комплекта не должны выделяться пузырьки воздуха.

Прозрачность. В качестве стандартной суспензии выступает суспензия с первичной мутностью *(2.2.1)*, разбавленная в соотношении 1:8 для комплектов с трубкой с внешним диаметром менее 5 мм и разбавленная в соотношении 1:16 для комплектов с трубкой с внешним диаметром 5 мм и более. Пропускают стандартную суспензию через комплект и сравнивают с другим комплектом из этой серии, заполненным *водой Р*. Должно наблюдаться наличие мутности и пузырьки.

Сухой остаток. 50,0 мл раствора S выпаривают досуха на водяной бане и высушивают до постоянной массы в сушильном шкафу при температуре (100-105)^{0}С. Параллельно проводят контрольный опыт, используя 50,0 мл *воды для инъекций Р*. Разность между массами сухих остатков не должна превышать 1,5 мг.

Стерильность *(2.6.1)*. Комплекты должны выдерживать испытания на стерильность. Если требуется, чтобы комплект был стерильным только изнутри, пропускают через него 50 мл буферного раствора с натрия хлоридом и пептоном с pH 7,0 *(2.6.12)* , затем анализируют его методом мембранной фильтрации.

Если комплект должен быть стерильным снаружи и изнутри, вскрывают упаковку с соблюдением требований асептики и:

- при использовании метода прямого посева помещают комплект или его отдельные части в соответствующую емкость, содержащую достаточное количество питательной среды для полного погружения комплекта;
- при использовании метода мембранной фильтрации помещают комплект или его отдельные части в соответствующую емкость, содержащую достаточное количество буферного раствора с натрия хлоридом и пептоном с pH 7,0 *(2.6.12)* для его полного промывания в течение 10 мин.

Пирогенные вещества *(2.6.8)*. Пять комплектов присоединяют друг к другу и пропускают через полученную установку со скоростью не более 10 мл/мин 250 мл стерильного, свободного от пирогенных веществ раствора 9 г/л *натрия хлорида Р*. В асептических условиях собирают раствор в контейнер, свободный от пирогенных веществ. Раствор должен выдерживать испытания на пирогенность. На 1 кг массы кролика вводят 10 мл раствора.

МАРКИРОВКА

Если необходимо, на этикетке указывают, что стерилизация комплекта проводилась с использованием этиленоксида.

3.2.8. СТЕРИЛЬНЫЕ ОДНОРАЗОВЫЕ ПЛАСТМАССОВЫЕ ШПРИЦЫ

Стерильные одноразовые пластмассовые шприцы – это медицинские изделия, используемые для непосредственного введения инъекционных лекарственных средств. Они должны быть стерильными и свободными от пирогенных веществ, не подвергаются повторной стерилизации и повторному использованию. Шприцы состоят из цилиндра и поршня, который может быть снабжен эластичным уплотнительным кольцом; могут комплектоваться иглой, которая может быть несъемной. Каждый шприц должен быть индивидуально упакован для обеспечения стерильности.

Цилиндр шприца должен быть прозрачным для обеспечения точности дозирования, а также контроля отсутствия пузырьков и посторонних частиц.

Пластмассовые и эластичные материалы для производства цилиндров и поршней должны соответствовать определенной спецификации или требованиям компетентного уполномоченного органа. Наиболее часто используемые материалы – полипропилен и полиэтилен. Шприцы должны соответствовать действующим на данный момент стандартам размеров и эксплуатационных характеристик.

На внутреннюю стенку шприца для обеспечения плавной работы поршня может наноситься масло силиконовое *(3.1.8)*, но в количестве, не допускающем загрязнение содержимого в процессе использования.

Чернила, краска и клей, используемые для маркировки шприцев, нанесения надписи на упаковку, а также, если необходимо, на комплекты шприц / упаковка, не должны проникать через стенку шприцев.

ИСПЫТАНИЯ

Раствор S. Раствор готовят таким образом, чтобы предотвратить его загрязнение посторонними частицами. Используя достаточное количество шприцев для получения 50 мл раствора, наполняют их до номинального объема *водой для инъекций Р* и выдерживают при температуре 37^{0}С в течение 24 ч. Объединяют содержимое шприцев в емкость из боросиликатного стекла.

Внешний вид раствора. Раствор S должен быть прозрачным *(2.2.1)*, бесцветным *(2.2.2., Метод II)* и свободным от посторонних твердых частиц.

Кислотность или щелочность. К 20 мл раствора S прибавляют 0,1 мл раствора *бромтимолового синего Р1*. Для изменения окраски индикатора должно потребоваться не более 0,3 мл *0,01 М раствора натрия гидроксида* или *0,01 М раствора кислоты хлористоводородной*.

Оптическая плотность *(2.2.25)*. Оптическая плотность раствора S в диапазоне длин волн от 220 нм до 360 нм не должна превышать 0,40.

Этиленоксид. Если на этикетке указано, что для стерилизации использовался этиленоксид, то его содержание, определенное нижеописанным методом, не должно превышать 10 ppm. Определение проводят методом газовой хроматографии *(2.2.28)*.

Условия хроматографирования:

- колонка из нержавеющей стали длиной 1,5 м, с внутренним диаметром 6,4 мм, заполненная сорбентом *диатомит силанизированный для газовой хроматографии Р,* импрегированным *макроголем 1500 Р* (3 г на 10 г),
- газ–носитель – *гелий для хроматографии Р*; скорость газа–носителя – 20 мл/мин;
- детектор пламенно-ионизационный;
- температура колонки – 40^{0}С;
- температура блока ввода проб – 100^{0}С;
- температура детектора – 150^{0}С.

Проверяют отсутствие пиков, выходящих одновременно с пиком этиленоксида, проводя в следующих условиях хроматографирования испытание на нестерильных шприцах:

- колонка из нержавеющей стали длиной 3 м, с внутренним диаметром 3,2 мм, заполненная сорбентом *диатомит силанизированный для газовой хроматографии Р,* импрегированным *трисцианоэтоксипропаном Р* (2 г на 10 г),
- газ–носитель – *гелий для хроматографии Р*; скорость газа–носителя – 20 мл/мин;
- детектор пламенно-ионизационный;
- температура колонки – 60^0С;
- температура блока ввода проб – 100^0С;
- температура детектора – 150^0С.

Раствор этиленоксида. Готовят в вытяжном шкафу. Во флакон вместимостью 50 мл помещают 50,0 мл *диметилацетамида Р*, укупоривают, закрепляют пробку и взвешивают с точностью до 0,1 мг. Полиэтиленовый или полипропиленовый шприц вместимостью 50 мл наполняют газообразным *этиленоксидом Р*, оставляют газ в контакте со шприцем в течение 3 мин, освобождают шприц от содержимого и снова наполняют его 50 мл газообразного *этиленоксида Р*. Присоединяют к шприцу гиподермальную иглу и уменьшают объем газа в шприце от 50 мл до 25 мл. Медленно вводят эти 25 мл во флакон, аккуратно встряхивая и предотвращая контакт между иглой и жидкостью. Снова взвешивают флакон: увеличение массы должно составлять от 45 мг до 60 мг, эта величина используется для расчета точной концентрации раствора (около 1 г/л).

Градуировочный график. В серию из семи флаконов аналогичных флакону для испытания, содержащих по 150 мл *диметилацетамида Р*, помещают соответственно 0 мл, 0,05 мл, 0,10 м, 0,20 мл, 0,50 мл, 1,00 мл и 2,00 мл раствора этиленоксида. Полученные таким образом растворы содержат 0 мкг, 50 мкг, 100 мкг, 200 мкг, 500 мкг, 1000 мкг и 2000 мкг этиленоксида. Флаконы укупоривают, закрепляют пробки и помещают в сушильный шкаф при температуре $(70\pm1)^0$С на 16 ч. Отбирают из каждого флакона по 1 мл горячего газа, вводят в колонку, по высоте полученных пиков и содержанию этиленоксида в каждом флаконе строят градуировочный график.

Испытание. После удаления упаковки взвешивают шприц. Разрезают его на части с максимальным размером стороны 1 см, которые помещают во флакон вместимостью от 250 мл до 500 мл, содержащий 150 мл *диметилацетамида Р*. Укупоривают флакон и закрепляют пробку. Помещают флакон в сушильный шкаф с температурой $(70\pm1)^0$С на 16 ч. Отбирают из флакона 1 мл горячего газа и вводят в колонку. Содержание этиленоксида вычисляют, используя градуировочный график по высоте полученных пиков.

Масло силиконовое. Вычисляют площадь внутренней поверхности шприца (см^2) по формуле:

$$2\sqrt{V \cdot p \cdot h}$$

где,

V - номинальный объем шприца, см^3,

h - высота градуировки, см.

Берут достаточное количество шприцев для обеспечения площади внутренней поверхности то 100 см^2 до 200 см^2. В каждый шприц вводят количество *мети-*

ленхлорида Р , равное половине его номинального объема, и доводят объем до номинального воздухом. Промывают внутреннюю стенку, соответствующую номинальному объему шприца растворителем, путем переворачивания его 10 раз, закрывая элемент для присоединения иглы пальцем, покрытым пластмассовой пленкой, инертной к метиленхлориду. Собирают экстракты в предварительно высушенную до постоянной массы и взвешенную чашку и повторяют операцию. Выпаривают объединенные экстракты досуха на водяной бане. Высушивают при температуре (100-105)^{0}С в течение 1 ч. Масса полученного остатка не должна превышать 0,25 мг на 1 см^2 площади внутренней поверхности.

Инфракрасный спектр *(2.2.24)* полученного остатка должен иметь максимумы при волновых числах, соответствующих маслу силиконовому: 805 см$^{-1}$, 1020 см$^{-1}$, 1095 см$^{-1}$, 1260 см$^{-1}$ и 2960 см$^{-1}$.

Восстановители. К 20,0 мл раствора S прибавляют 2 мл *кислоты серной Р* и 20,0 мл *0,002 М раствора калия перманганата*. Кипятят в течение 3 мин и сразу охлаждают. Прибавляют 1 г *калия иодида Р* и титруют *0,01 М раствором натрия тиосульфата*, используя в качестве индикатора 0,25 мл *раствора крахмала Р*. Параллельно проводят контрольный опыт, используя 20,0 мл *воды для инъекций Р.* Разность между объемами титранта не должна превышать 3,0 мл.

Прозрачность. Наполняют один шприц *водой Р* (контрольный опыт), другой шприц - суспензией с первичной мутностью *(2.2.1)*, разведенной 1:10. Суспензию с первичной мутностью предварительно выдерживают при температуре (20±2)^{0}С в течение 24 ч. При сравнении невооруженным глазом в рассеянном свете на темном фоне должна быть заметна мутность суспензии.

Стерильность *(2.6.1). Если указано, что шприцы должны быть стерильными, для них проводят испытание на стерильность следующим образом.* В асептических условиях вскрывают упаковку, вынимают шприц, разбирают его по частям и помещают каждую часть в емкость, содержащую достаточное количество питательной среды для полного погружения шприца. Используют обе рекомендованные среды *(2.6.1)*

Если указано, что шприцы должны быть стерильными только изнутри, для них проводят испытание на стерильность следующим образом. Для каждого из испытуемых шприцев используют 50 мл питательной среды. В асептических условиях снимают защитный колпачок с иглы и погружают иглу в питательную среду. Промывают шприц пять раз с помощью положения поршня, которое обеспечивает максимально возможный уровень наполнения.

Пирогенные вещества *(2.6.8)*. Шприцы, имеющие номинальный объем, равный или более 15 мл, должны выдерживать испытание на пирогенность. Не менее 3 шприцев наполняют до номинального объема свободным от пирогенных веществ раствором 9 г/л *натрия хлорида* Р и выдерживают при температуре 37^{0}С в течение 2 ч. В асептических условиях объединяют растворы в емкость, свободную от пирогенных веществ, и выполняют испытание немедленно, используя на 1 кг массы каждого кролика 10 мл раствора.

МАРКИРОВКА

На этикетке упаковки указывают:
- номер серии,
- описание шприца,
- «только для одноразового использования».

На этикетке вторичной упаковки указывают:
- метод стерилизации,
- «стерильно» или «стерильно только изнутри»,
- информацию о производителе,
- «не использовать шприц при нарушении упаковки и стерильности».

3.2.9. РЕЗИНОВЫЕ УКУПОРОЧНЫЕ СРЕДСТВА ДЛЯ КОНТЕЙНЕРОВ, ПРЕДНАЗНАЧЕННЫХ ДЛЯ ВОДНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ ДЛЯ ПАРЕНТЕРАЛЬНОГО ПРИМЕНЕНИЯ, ПОРОШКОВ И ЛИОФИЛИЗИРОВАННЫХ ПОРОШКОВ

Резиновые укупорочные средства для контейнеров, предназначенных для водных лекарственных средств для парентерального применения, порошков и лиофилизированных порошков производят из материалов, полученных методом вулканизации (поперечным сшиванием) макромолекулярных органических веществ (эластомеров) с соответствующими добавками. Требования данной статьи распространяются также на укупорочные средства для контейнеров, предназначенных для лиофилизированных порошков и продуктов, которые растворяют в воде непосредственно перед использованием. Требования данной статьи не распространяются на укупорочные средства, изготовленные из силиконового эластомера (который должен отвечать требованиям раздела *3.1.9. Силиконовый эластомер для укупорочных материалов и трубок*), на ламинированные или лакированные укупорочные средства. Эластомеры получают из природных или синтетических веществ, используя полимеризацию, аддитивную полимеризацию или поликонденсацию. Природа основных веществ и используемых добавок (например, вулканизаторов, катализаторов, стабилизаторов, красителей) зависит от требований, предъявляемых к конечному продукту.

Резиновые укупорочные средства можно классифицировать на два типа: тип I – пробки, которые соответствуют более строгим требованиям и являются предпочтительными для использования; тип II – пробки, которые имеют механические свойства для специальных целей (например, для многоразового прокалывания) и не отвечают строгим требованиям, предъявляемым к пробкам типа I из-за своего химического состава.

К средствам, используемым для укупоривания конкретного лекарственного средства, предъявляют следующие требования:
- компоненты лекарственного средства, находящиеся в контакте с пробкой, не должны адсорбироваться на поверхности пробки, а также проникать в пробку или через ее поверхность в таком количестве, которое отрицательно влияет на качество лекарственного средства,
- пробка не должна выделять в лекарственное средство какие-либо вещества в количествах, способных повлиять на его стабильность или повышающих его токсичность.

Пробка должна быть совместима с лекарственным средством в течение всего периода его хранения и применения.

Производитель лекарственного средства должен получить гарантии от поставщика укупорочных средств в том, что состав укупорочного средства не изменяется и является идентичным тем, что подвергались испытаниям на совместимость. В том случае, если поставщик информирует производителя лекарственного средства об изменении в составе, испытания на совместимость следует проводить повторно в полном объеме или частично, в зависимости от характера изменений.

Пробки перед использованием моют и, если необходимо, стерилизуют.

СВОЙСТВА

Резиновые укупорочные средства эластичны, полупрозрачны или непрозрачны, не имеют характерного окрашивания, которое зависит от вида используемых добавок. Практически не растворимы в тетрагидрофуране, в котором, однако, может наблюдаться значительное обратимое набухание. Гомогенны и практически не содержат посторонних включений (например, волокон, механических частиц, отходов резины).

Идентификация типа резины, используемой для производства укупорочных средств, не ограничивается требованиями данной статьи. Идентификационные испытания, приведенные ниже, различают эластомерные и неэластомерные укупорочные средства, но не дифференцируют разные виды резины. С целью выявления различий в сериях по сравнению с пробками, используемыми в испытаниях на совместимость, выполняют другие идентификационные испытания. Для этого могут использоваться один или несколько аналитических методов: определение относительной плотности, определение сульфатной золы, определение содержания серы, тонкослойная хроматография экстракта, ультрафиолетовая абсорбционная спектрофотометрия экстракта, инфракрасная абсорбционная спектрофотометрия продуктов пиролиза.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ

А. Эластичность материала должна быть такой, чтобы ленту с поперечной шириной от 1 мм^2 до 5 мм^2 можно было растянуть вручную в 2 раза по сравнению с исходной длиной. Будучи растянутой в 2 раза в течение 1 мин, она должна сжиматься до первоначального размера, или не менее чем в 1,2 раза в течение 30 с.

В. От 1 г до 2 г материала нагревают в термостойкой пробирке над открытым пламенем до высушивания образца, продолжают нагревание до конденсации паров продуктов пиролиза у верхнего края пробирки. Осаждают несколько капель продуктов пиролиза на диске с калия бромидом. Инфракрасный спектр *(2.2.24)* полученного диска должен быть идентичен спектру типового образца.

С. Содержание общей золы *(2.4.16)* должно быть в пределах (±10) % от результата, полученного для типового образца.

ИСПЫТАНИЯ

Анализируемые образцы моют и стерилизуют перед использованием.

Раствор S. Неразрезанные пробки в количестве, соответствующем общей площади поверхности около 100 см^2, помещают в подходящую стеклянную емкость, заливают *водой для инъекций Р*, кипятят в течение 5 мин и промывают пять раз холодной *водой для инъекций Р*. Промытые пробки переносят в широкогорлую колбу (стекло класса I, *3.2.1*), прибавляют 200 мл *воды для инъекций Р* и взвешивают. Закрывают отверстие колбы лабораторным стаканом из боросиликатного стекла. Нагревают в автоклаве таким образом, чтобы за 20-30 мин температура достигла (121±2)^{0}С и выдерживают при данной температуре в течение 30 мин. Охлаждают до комнатной температуры в течение 30 мин и доводят до первоначальной массы *водой для инъекций Р*. Встряхивают и немедленно отделяют раствор от пробок декантацией. Перед началом каждого испытания встряхивают раствор S.

Контрольный раствор. Готовится аналогично раствору S с использованием 200 мл *воды для инъекций Р*.

Внешний вид раствора. Мутность раствора S не должна превышать мутность суспензии сравнения II для пробок типа I и мутность суспензии сравнения III для пробок типа II *(2.2.1)*. Раствор S должен быть окрашен не более интенсивно, чем раствор сравнения GY_5 *(2.2.1, Метод II)*.

Кислотность или щелочность. К 20 мл раствора S прибавляют 0,1 мл раствора *бромтимолового синего Р1*. Для изменения окраски раствора на синюю или желтую должно потребоваться не более 0,3 мл *0,01 М раствора натрия гидроксида* или не более 0,8 мл *0,01 М раствора кислоты хлористоводородной* соответственно.

Оптическая плотность. *Испытание выполняют в течение не более 5 ч после приготовления раствора S.* Раствор S фильтруют через мембранный фильтр с размером пор около 0,45 мкм, отбрасывая первые порции фильтрата. Измеряют оптическую плотность *(2.2.25)* фильтрата в области длин волн от 220 нм до 360 нм, используя в качестве раствора сравнения контрольный раствор (см. Раствор S). Оптическая плотность в данном диапазоне длин волн не должна превышать 0,2 для пробок типа I и 0,4 для пробок типа II. Если необходимо, разбавляют фильтрат перед измерением и корректируют результат с учетом разведения.

Восстановители. *Испытание выполняют в течение не более 5 ч после приготовления раствора S.* К 20,0 мл раствора S прибавляют 2 мл *кислоты серной разведенной Р* и 20,0 мл *0,002 М раствора калия перманганата*. Кипятят в течение 3 мин и охлаждают. Прибавляют 1 г *калия иодида Р* и немедленно титруют *0,01 М раствором натрия тиосульфата*, используя в качестве индикатора 0,25 мл *раствора крахмала Р*. Параллельно проводят контрольный опыт, используя 20,0 мл контрольного раствора. Разность между объемами титранта не должна превышать 3,0 мл для пробок типа I и 7,0 мл для пробок типа II.

Аммоний *(2.4.1)*: Не более 2 ppm.

5 мл раствора S доводят *водой Р* до 14 мл. Полученный раствор должен выдерживать испытание А на предельное содержание аммония.

Экстрагируемый цинк: не более 5 мкг в 1 мл раствора S.

Испытание проводят методом атомно-абсорбционной спектрометрии *(2.2.23, Метод I).*

Испытуемый раствор. 10,0 мл раствора S доводят *0,1 М раствором кислоты хлористоводородной* до 100 мл.

Растворы сравнения. Растворы сравнения готовят разбавлением *эталонного раствора цинка (10 ppm Zn) Р 0,1 М раствором кислоты хлористоводородной*.

Источник излучения: лампа с полым цинковым катодом.

Длина волны: 213,9 нм.

Пламя: воздушно-ацетиленовое.

Экстрагируемые тяжелые металлы *(2.4.8)*: не более 2 ppm.

Раствор S должен выдерживать испытание А на предельное содержание тяжелых металлов. Стандартный раствор готовят, используя *эталонный раствор свинца (2 ppm Pb) Р*.

Сухой остаток. 50,0 мл раствора S выпаривают досуха на водяной бане и высушивают до постоянной массы в сушильном шкафу при температуре (100-105)^{0}С. Масса полученного остатка не должна превышать 2,0 мг для пробок типа I и 4,0 мг для пробок типа II.

Летучие сульфиды. Пробки, если необходимо, предварительно разрезанные, с общей площадью поверхности (20±2) см^2 помещают в коническую колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл раствора 20 г/л *кислоты лимонной Р*. Над горлом колбы помещают кусочек *свинцово-ацетатной бумаги Р* и удерживают бумагу в таком положении, помещая сверху перевернутый флакон для взвешивания. Нагревают в автоклаве при температуре (121±2)^{0}С в течение 30 мин. Появившееся черное пятно на бумаге должно быть окрашено не более интенсивно, чем пятно в контрольном испытании, выполненном с использованием 0,154 мг *натрия сульфата Р* и 50 мл раствора 20 г/л *кислоты лимонной Р*.

Для испытаний на проницаемость, расщепление и самогерметизацию используют пробки, обработанные, как указано при приготовлении раствора S и высушенные.

Проницаемость. Для пробок, вскрываемых с помощью гиподермальной иглы, проводят следующее испытание. 10 флаконов наполняют до номинального объема *водой Р*, закрывают испытуемыми пробками и укупоривают колпачками. Прокалывают каждую пробку перпендикулярно поверхности пробки, используя для каждой пробки новую смазанную гиподермальную иглу с длинным скосом[1] (угол скоса 12±2^0) и наружным диаметром 0,8 мм. Требуемое для прокалывания усилие, измеренное с точностью до ± 0,25 Н (25 гс), не должно превышать 10 Н (1 кгс) для каждой пробки.

Фрагментация. Для пробок, вскрываемых с помощью гиподермальной иглы, проводят следующее испытание. Если пробки предназначены для укупоривания водных лекарственных средств, в 12 чистых флаконов помещают объем *воды Р* меньше номинального объема на 4 мл, закрывают флаконы испытуемыми пробками, укупоривают колпачками и оставляют на 16 ч. Если пробки предназначены для укупоривания сухих лекарственных средств, 12 чистых флаконов закрывают испытуемыми пробками. С помощью чистого шприца, снабженного смазанной гиподермальной иглой с длинным скосом[1] (угол скоса 12 ± 2^0) и наружным диаметром 0,8 мм, используя для каждой пробки новую иглу, вводят во флакон 1 мл *воды Р* и удаляют 1 мл воздуха. Операцию повторяют 4 раза для каждого флакона, прокалывая его каждый раз в новом месте. Для каждой пробки используют новую иглу и контролируют, чтобы игла не затупилась в ходе испытания. Жидкость во флаконах фильтруют через фильтр с размером отверстий 0,5 мкм. Считают количество кусочков резины, видимых невооруженным глазом. Общее их количество не должно превышать 5. Предполагается, что частицы диаметром 50 мкм и более видны невооруженным глазом, в сомнительных случаях частицы просматривают под микроскопом для проверки их природы и размера.

Самогерметизация. Для пробок, предназначенных для использования с мультидозовыми контейнерами, проводят следующее испытание. 10 флаконов наполняют *водой Р* до номинального объема, закрывают испытуемыми пробками и укупоривают колпачками. Прокалывают каждую пробку 10 раз, каждый раз в новом месте с помощью гиподермальной иглы с длинным скосом[1] (угол скоса 12 ± 2^0) и наружным диаметром 0,8 мм. Для каждой пробки используют новую иглу. Помещают флаконы вертикально в раствор 1 г/л *метиленового синего Р* и понижают внешнее давление до 27 кПа в течение 10 мин. Затем восстанавливают давление до атмосферного и оставляют в течение 30 мин. Промывают флаконы снаружи. Ни один из флаконов не должен иметь каких-либо следов окрашенного раствора.

4. РЕАКТИВЫ

4.1. РЕАКТИВЫ, ЭТАЛОННЫЕ РАСТВОРЫ, БУФЕРНЫЕ РАСТВОРЫ

В тех случаях, когда название реактива или раствора реактива сопровождается буквой Р и выделено курсивом, это указывает на то, что реактив включен в нижеприведенный перечень.

В описании каждого реактива, кроме обозначенного значком #, имеется семизначный код, выделенный курсивом (например, 1002501). Этот номер остаётся неизменным для каждого реактива при всех последующих пересмотрах перечня. Он может быть использован для идентификации реактива и, например, при учете и складировании реактивов. Описание может также включать номер Chemical Abstract Service Registry (CAS), легко опознаваемый по характерному обозначению, например, 9002-93-1

Некоторые из реактивов, включенных в перечень, являются токсичными и при работе с ними необходимо соблюдать соответствующие меры предосторожности.

Водные растворы реактивов готовят с использованием воды Р. Если раствор реактива описывают выражением типа «раствор 10 г/л кислоты хлористоводородной», раствор готовят соответствующим разведением водой Р более концентрированного раствора реактива, приведенного в этом же разделе. Растворы реактивов, используемые для испытаний на предельное содержание бария, кальция и сульфатов, готовят с использованием воды дистиллированной Р. Если растворитель не указан, то подразумевают водный раствор.

Реактивы и растворы реактивов должны храниться в плотно укупоренных контейнерах.

4.1.1. РЕАКТИВЫ

\# **Агар пищевой.** Пористые пластины толщиной не более 20 мм или пленки толщиной не более 0,5 мм белого или светло-желтого цвета; допускается слегка сероватый оттенок.

Агароза для хроматографии. *1001800.* [9012-36-6].
4% суспензия в *воде Р* набухших гранул диаметром от 60 мкм до 140 мкм. Используют в гель-хроматографии для разделения белков с молекулярными массами от $6 \cdot 10^4$ до $20 \cdot 10^6$ и полисахаридов с молекулярными массами от $3 \cdot 10^3$ до $5 \cdot 10^6$.

Агароза поперечно-сшитая для хроматографии. *1001900.* [61970-08-9].

Получают из агарозы реакцией с 2,3-дибромпропанолом в сильно щелочной среде.
4% суспензия в *воде Р* набухших гранул диаметром от 60 мкм до 140 мкм. Используют в гель-хроматографии для разделения белков с молекулярными массами от $6 \cdot 10^4$ до $20 \cdot 10^6$ и полисахаридов с молекулярными массами от $3 \cdot 10^3$ до $5 \cdot 10^6$.

Агароза поперечно-сшитая для хроматографии Р1. 1001901. [65099-79-8].

Получают из агарозы реакцией с 2,3-дибромпропанолом в сильно щелочной среде.
4% суспензия в *воде* Р набухших гранул диаметром от 60 мкм до 140 мкм. Используют в гель-хроматографии для разделения белков с молекулярными массами от $7 \cdot 10^4$ до $40 \cdot 10^6$ и полисахаридов с молекулярными массами от $1 \cdot 10^5$ до $2 \cdot 10^7$.

Агароза для электрофореза. *1002000.* [9012-36-6].

Нейтральный линейный полисахарид, основной компонент которого получают из агара.

Порошок белого или почти белого цвета. Практически нерастворима в холодной воде, очень мало растворима в горячей воде.

Агароза-ДЭАЭ для ионообменной хроматографии. *1002100.* [57407-08-6].

Поперечно-сшитая агароза, с замещенными диэтиламиноэтильными группами, в виде шарообразных гранул.

Агароза/поперечно-сшитый полиакриламид. *1002200.*

Агароза в поперечно-сшитой полиакриламидной матрице. Используют для разделения глобулярных белков с молекулярными массами от $2 \cdot 10^4$ до $35 \cdot 10^4$.

Аденозин. $C_{10}H_{13}N_5O_4$. *(М.м.* 267,2). *1001600.* [58-61-7].

6-Амино-9-β - D-рибофуранозил-9*H*-пурин.

Кристаллический порошок белого цвета. Мало растворим в воде, практически нерастворим в ацетоне, 96% спирте и эфире. Растворяется в разведенных растворах кислот.

Температура плавления: около 234°С.

Адипиновая кислота. $C_6H_{10}O_4$. *(М.м.* 146,1). *1095600.* [124-04-9].

Кристаллы в виде призм. Легко растворима в метаноле, растворима в ацетоне, практически нерастворима в петролейном эфире.

Температура плавления: около 152°С.

Азометин Н. $C_{17}H_{12}NNaO_8S_2$. *(М. м.* 445,4). *1008700.* [5941-07-1].

Натрия 4-гидрокси-5-(2-гидрокси-бензилиденамино)-2,7-нафталиндисульфонат кислый.

Азометина Н раствор. *1008701.*

0,45 г *азометина Н Р* и 1 г *кислоты аскорбиновой Р* растворяют в *воде* Р при слабом нагревании и доводят объём раствора тем же растворителем до 100 мл.

Азот. N_2. *(М. м.* 28,01). *1059300.* [7727-37-9].

Азот промытый и высушенный.

Азот Р1. 1059400.

Содержит не менее 99,999*% (об/об)* N_2.

Углерода монооксид: не более 5 ppm.

Кислород: не более 5 ppm.

Азот для хроматографии. *1059500.*

Содержит не менее 99,95*% (об/об)* N_2.

Азот, свободный от кислорода. *1059600.*

Азот Р очищают от кислорода пропусканием через *раствор пирогаллола щелочной Р.*

Азота закись. N_2O. *(М.м.* 44,01). *1108500.*

Содержит не менее 99,99*% (об/об)* N_2O.

Азота монооксид: не более 1 ppm.

Углерода монооксид: не более 1 ppm.

Азота монооксид. NO. *(М.м.* 30,01). *1108300.*

Содержит не менее 98,0*% (об/об)* NO.

Азотная кислота (# азотная кислота концентрированная). HNO_3. *(М.м.* 63,0). *1058400.* [7697-37-2].

Содержит не менее 63,0% *(м/м)* и не более 70,0% *(м/м)* HNO_3.

Прозрачная, бесцветная или почти бесцветная жидкость, смешивается с водой.

d_{20}^{20}*:* от 1,384 до 1,416.

Раствор 10 г/л является сильной кислотой и даёт реакцию на нитраты *(2.3.1).*

Прозрачность (2.2.1). Кислота азотная должна быть прозрачной.

Цветность (2.2.2, метод II). Окраска кислоты азотной должна быть не интенсивнее эталона Y_6.

Хлориды (2.4.4). Не более 0,00005% (0,5 ppm). К 5 г кислоты азотной прибавляют 10 мл *воды Р* и 0,3 *мл раствора серебра нитрата Р2,* выдерживают в течение 2 мин в защищённом от света месте. Полученный раствор должен выдерживать испытание на хлориды. Эталон готовят с использованием смеси 13 мл *воды* Р, 0,5 мл *кислоты азотной Р,* 0,5 мл *эталонного раствора хлорида (5 ppm Cl)* Р и 0,3 мл *раствора серебра нитрата Р2.*

Сульфаты (2.4.13). Не более 0,0002% (2 ppm). К 10 г кислоты азотной прибавляют 0,2 г *натрия карбоната Р* и выпаривают досуха; остаток растворяют в 15 мл *воды дистиллированной Р.* Полученный раствор должен выдерживать испытание на сульфаты. Эталон готовят с использованием 2 мл *эталонного раствора сульфата (10 ppm* SO_4*) Р* и 13 мл *воды дистиллированной Р.*

Мышьяк (2.4.2, метод А). Не более 0,000002% (0,02 ppm). К 50 г кислоты азотной прибавляют 0,5 мл *кислоты серной Р* и осторожно нагревают до появления белых паров; к остатку прибавляют 1 мл раствора 100 г/л *гидроксиламина гидрохлорида Р* и доводят *водой Р* до объёма 2 мл. Полученный раствор должен выдерживать испытание на мышьяк. Эталон готовят с использованием 1,0 мл *эталонного раствора мышьяка (1 ppm As) Р.*

Тяжелые металлы (2.4.8, метод А). Не более 0,0002% (2 ppm). 10 мл раствора, приготовленного для испытания на железо, доводят *водой Р* до объёма 20 мл. 12 мл полученного раствора должны выдерживать испытание на тяжелые металлы. Эталон готовят с использованием *эталонного раствора свинца (2 ppm Pb) Р.*

Железо(2.4.9). Не более 0,0001%(1 ppm). Осадок, полученный при испытании на сульфатную золу, растворяют в 1 мл *кислоты хлористоводородной разведенной* Р и доводят объём раствора *водой* Р до 50 мл. 5 мл полученного раствора доводят *водой Р* до объёма 10 мл. Полученный раствор должен выдерживать испытание на железо.

Сульфатная зола. Не более 0,001%. 100 г кислоты азотной осторожно выпаривают досуха; остаток смачивают несколькими каплями *кислоты серной Р* и нагревают до бледно-красного цвета.

Количественное определение. К 1,50 г кислоты азотной прибавляют около 50 мл *воды Р* и титруют 1 *М раствором натрия гидроксида,* используя в качестве индикатора 0,1 *мл раствора метилового красного Р.*

1 мл 1 *М раствора натрия гидроксида* соответствует 63,0 мг HNO_3.

Хранят в защищённом от света месте.

Азотная кислота, свободная от свинца. *1058403.*

Кислота азотная Р должна выдерживать следующее дополнительное испытание. К 100 г *кислоты азотной Р* прибавляют 0,1 г *натрия карбоната безводного Р и* выпаривают досуха; остаток растворяют в *воде Р* при слабом нагревании и доводят объём раствора тем же растворителем до 50,0 мл. Содержание свинца определяют методом атомно-абсорбционной спектрометрии *(2.2.23, метод II).* Интенсивность поглощения измеряют при длине волны 283,3 нм или 217,0 нм, используя в качестве источника излучения лампу с полым свинцовым катодом и воздушно-ацетиленовое пламя. Не более 0,00001% (0,1 ppm Pb).

Азотная кислота, свободная от свинца и кадмия. *1058401.*

Кислота азотная Р должна выдерживать следующие дополнительные испытания.

Испытуемый раствор. К 100 г *кислоты азотной Р* прибавляют 0,1 г *натрия карбоната безводного Р,* выпаривают досуха; остаток растворяют в *воде Р* при слабом нагревании и доводят объём раствора тем же растворителем до 50,0 мл.

Кадмий. Не более 0,00001% (0,1 ppm). Содержание кадмия определяют методом атомно-абсорбционной спектрометрии *(2.2.23, метод II).* Интенсивность поглощения измеряют при длине волны 228,8 нм, используя в качестве источника излучения лампу с полым кадмиевым катодом и воздушно-ацетиленовое или воздушно-пропановое пламя.

Свинец. Не более 0,00001% (0,1 ppm). Содержание свинца определяют методом атомно-абсорбционной спектрометрии *(2.2.23, метод II).* Интенсивность поглощения измеряют при длине волны 283,3 нм или 217,0 нм, используя лампу с полым свинцовым катодом и воздушно-ацетиленовое пламя.

Азотная кислота разведенная. *1058402.*

Содержит около 125 г/л HNO_3 (*М.м.* 63,0).

20 г *кислоты азотной Р* доводят *водой Р* до объёма 100 мл.

\# **Азотная кислота разведенная Р1.**

Смешивают 1 ч. *азотной кислоты концентрированной Р* и 1 ч. *воды дистиллированной Р*. Плотность 1,186-1,210. Содержание азотной кислоты 31-34%.

\# **Азотная кислота разведенная Р2.**

Смешивают 1 ч. *азотной кислоты Р1* и 1 ч. *воды дистиллированной Р*. Плотность 1,087-1,096. Содержание азотной кислоты 15,5-17,0%.

Азотная кислота дымящаяся. *1058500.* [52583-42-3].

Прозрачная жидкость, слегка желтоватого цвета, дымящаяся на воздухе.

d_{20}^{20} : около 1,5.

Акриламид. C_3H_5NO. *(М.м.* 71,1). *1001500.* [79-06-1]. Пропенамид.

Бесцветные или белого цвета хлопья или кристаллический порошок белого или почти белого цвета. Очень легко растворим в воде и метаноле, легко растворим в этаноле.

Температура плавления: около 84°C.

Акриламид-бисакриламида (29: 1) 30% раствор. *1001501.*

290 г *акриламида Р* и 10 г *метиленбисакриламида Р* растворяют в 1 л *воды Р* и фильтруют.

Акриламид-бисакриламида (36,5:1) 30% раствор. *1001502.*
292 г *акриламида Р и* 8 г *метиленбисакриламида Р* растворяют в 1 л *воды Р* и фильтруют.

Акриловая кислота. $C_3H_4O_2$. *(М.м.* 72,1). [79-10-7]. Проп-2-еновая кислота. Винилмуравьиная кислота.

Содержит не менее 99% $C_3H_4O_2$. Стабилизирована 0,02% раствором монометилового эфира гидрохинона.
Едкая жидкость. Смешивается с водой и 96% спиртом. Легко полимеризуется в присутствии кислорода.
d_{20}^{20} : около 1,05.
n_D^{20} : около 1,421.

Температура кипения: около 141°C.
Температура плавления: от 12°C до15°C.

Аланин. $C_3H_7NO_2$. *(М.м.* 89,1). *1102900.* [56-41-7]. (*S*)-2аминопропионовая кислота.

Содержит не менее 98,5% и не более 101,0% $C_3H_7NO_2$ в пересчете на сухое вещество.
Белый или почти белый кристаллический порошок или бесцветные кристаллы. Легко растворим в воде, очень мало растворим в 96% спирте и практически нерастворим в эфире.
Хранят в защищенном от света месте.

β-Аланин. *1004500.* [107-95-9]. См. *3-Аминопропионовая кислота.*

Алеуриновая кислота. $C_{16}H_{32}O_5$. *(М.м.* 304,4). *1095700.* [533-87-9]. (9RS,10SR)-9,10,16-Тригидроксигексадекановая кислота.

Порошок белого цвета, жирный на ощупь. Растворима в метаноле.

Температура плавления: около 101°C.

Ализарин S. $C_{14}H_7NaO_7S \cdot H_2O$. *(М.м.* 360,3). *1002600.* [130-22-3]. Показатель Шульца №1145. Цветной индекс №58005. Натрия 1,2-дигидроксиантрахинон-3-сульфонат моногидрат. Натрия 3,4-дигидрокси-9,10-диоксо-9,10-дигидроантрацен-2-сульфонат моногидрат.

Порошок оранжево-жёлтого цвета. Легко растворим в воде и 96% спирте.

Ализарина S раствор. 1002601.

Раствор 1 г/л.

Испытание на чувствительность. Реактив изменяет окраску от жёлтой до оранжево-красной при установлении титра *0,05 М раствора бария перхлората (4.2.2).*

Изменение окраски. От жёлтой до фиолетовой в интервале pH 3,7-5,2.

Альбумин бычий. *1002300.* [9048-46-8].

Альбумин бычий сывороточный. Содержит около 96% белка.

Порошок от белого до светлого желтовато-коричневого цвета.

Вода (2.5.12). Не более 3,0%. Определение проводят из 0,800 г альбумина бычьего.

Альбумин бычий, используемый при количественном определении Тетракозактида, должен быть апирогенен и не должен проявлять протеолитическую активность при определении соответствующими методами, например, при использовании

хромогенного субстрата, и не должен обладать кортикостероидной активностью, определяемой измерением флуоресценции, как указано в статье Тетракозактид в количественном определении биологической активности.

Альбумина человеческого раствор. *1002400.* [9048-46-8].

Водный раствор белка, полученного из плазмы крови человека.

Прозрачная слегка вязкая жидкость, бесцветная или желтая или зеленая жидкость.

Альбумина человеческого раствор Р1. *1002401*
Альбумина человеческого раствор Р разводят раствором 9 г/л *натрия хлорида Р до* концентрации белка 1 г/л. Доводят рН раствора до 3,5-4,5 *кислотой уксусной ледяной Р.*

Альдегиддегидрогеназа. *1103000.*

Фермент, полученный из хлебопекарских дрожжей, окисляет ацетальдегид до кислоты уксусной в присутствии никотинамид-аденина динуклеотида, солей калия и тиолов при рН 8,0.

Альдегиддегидрогеназы раствор. *1103001.*

Количество *альдегиддегидрогеназы Р,* соответствующее 70 единицам, растворяют *в воде Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 10 мл. Раствор стабилен в течение 8 ч при температуре 4°С.

Алоген. См. *Барбалоин.*

Алюминий. Al. *(А.м.* 26,98). *1118200.* [7429-90-5].

Мягкий, ковкий металл белого с голубоватым оттенком цвета в виде брусков, листов, порошка, ленты или проволоки. На воздухе образуется окисная плёнка, которая защищает металл от коррозии.

Аналитической чистоты.

Алюминия-калия сульфат. $AlK(So_4)_2 \cdot 12H_2O$. *(М.м. 474,4*). *1003000.* [7784-24-9]. Квасцы.

Гранулированный порошок или бесцветная прозрачная кристаллическая масса. Легко растворим в воде, очень легко растворим в кипящей воде, растворим в глицерине и практически не растворим в 96% спирте.

Содержит 99,0-100,5% $AlK(So_4)_2 \cdot 12H_2O$.

Алюминия нитрат. $Al(N0_3)_3 \cdot 9H_2O$. *(М.м.* 375,1). *1002800.* [7784-27-2]. Алюминия нитрат нонагидрат.

Кристаллы, расплывающиеся на воздухе. Очень легко растворим в воде и 96% спирте, очень мало растворим в ацетоне.

Хранят в воздухонепроницаемом контейнере.

Алюминия оксид безводный. *1002900.* [1344-28-1].

Алюминия оксид, состоящий из *g* -Al_2O_3, обезвоженный и активированный нагревом. Размер частиц от 75 мкм до 150 мкм.

Алюминия оксид основный. 1118300.

Алюминия оксид безводный Р основной формы пригоден для хроматографических колонок.

pH (2.2.3). От 9 до 10. Измеряют pH суспензии, полученной встряхиванием 1 г с 10 мл *воды, свободной от углерода диоксида Р,* в течение 5 мин.

Алюминия оксид нейтральный. Al_2O_3. (*М.м.* 102,0). *1118400.*

Гранулированный порошок белого цвета.

Обменная ёмкость. 1,00 г *прокаина гидрохлорида Р* растворяют в *спирте (90%, об/об) Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 100 мл. 20,0 мл полученного раствора и 5,0 г испытуемого реактива помешают в колбу вместимостью 100 мл с притёртой стеклянной пробкой, отстаивают в течение 15 мин, периодически встряхивая, и фильтруют. К 10,0 мл фильтрата прибавляют 10 мл *воды Р,* 0,05 *мл раствора бромфенолового синего Р1* и титруют *0,1 М раствором кислоты хлористоводородной* до зелёного окрашивания. Окраска раствора должна измениться при прибавлении не более 1,4 мл *0,1 М раствора кислоты хлористоводородной.*

Водорастворимые вещества. Не более 0,2%. Используют хроматографическую колонку с внутренним диаметром 1 см, длиной 40 см, нижний конец которой сужен до диаметра от 2 мм до 3 мм и снабжён пористым стеклянным фильтром (100) или хлопковым тампоном выше суженой части. Колонку заполняют 10,0 г испытуемого реактива и 25 мл *воды Р,* элюируют *водой Р* до получения 20 мл прозрачного элюата, который выпаривают и сушат при температуре 150°C; масса остатка не должна превышать 20 мг.

Раствор S. Остаток, полученный в испытании «Водорастворимые вещества», растворяют при нагревании в *воде Р,* фильтруют и доводят объём фильтрата *водой Р до* 100 мл.

Хлориды (2.4.4). Не более 0,05%. 1 мл раствора S доводят *водой Р* до объёма 15 мл. Полученный раствор должен выдерживать испытание на хлориды.

Сульфаты (2.4.13). Не более 0,1%. 1 мл раствора S доводят *водой Р* до объёма 15 мл. Полученный раствор должен выдерживать испытание на сульфаты. Эталон готовят с использованием 10 мл *эталонного раствора сульфата (10 ppm* SO_4*) Р.*

Хроматографическая разделяющая способность. Хроматографическую колонку описанную в испытании «Водорастворимые вещества», заполняют испытуемым реактивом до высоты 5 см. Через колонку пропускают 5 *мл раствора азобензола Р* и 5 мл *метоксиазобензола Р,* затем промывают 20 мл смеси растворителей *бензол Р- петролейный эфир* Р(1:4). В верхней части колонки образуется слой метоксиазобензола ярко-жёлтого цвета толщиной от 3 мм до 5 мм, а ниже его наблюдается слой азобензола бледно-жёлтого цвета толщиной 2см.

Алюминия хлорид. $AlCl_3 \cdot 6H_2O$. (*М.м.* 241.4). *1002700.* [7784-13-6]. Алюминия хлорид гексагидрат.

Содержит не менее 98,0% $AlCl_3 \cdot 6H_2O$.

Кристаллический порошок от белого до слегка желтоватого цвета, гигроскопичен. Легко растворим в воде и 96% спирте, растворим в эфире.

Хранят в воздухонепроницаемом контейнере.

Алюминия хлорида раствор. *1002701.*

65,0 г *алюминия хлорида Р* растворяют в *воде Р* и доводят объем раствора тем же растворителем до 100 мл. Прибавляют 0,5 *г угля активированного Р,* перемешивают в течение 10 мин и фильтруют. К фильтрату при непрерывном перемешивании прибавляют достаточное количество раствора 10 г/л *натрия гидроксида Р* (около 60 мл) до получения pH около 1,5.

Алюминия хлорида реактив. *1002702.*

2,0 *г алюминия хлорида* Р растворяют в 100 мл раствора 5% *(об/об) кислоты уксусной ледяной Р* в *метаноле Р.*

Амидо-чёрный 10В. $C_{22}H_{14}N_6Na_2O_9S_2$. *(М.м.* 617). *1003100.* [1064-48-8]. Показатель Шульца №299. Цветной индекс №20470. Динатрия 5-амино-4-гидрокси-6-[(4-нитрофенил)азо]-3-(фенилазо)-нафталин-2,7-дисульфонат.

Порошок от темно-коричневого до чёрного цвета. Умеренно растворим в воде, растворим в 96% спирте.

Амидо-чёрного 10В раствор. *1003101.*

Раствор 5 г/л *амидо-чёрного 10В Р* в смеси растворителей *кислота уксусная Р - метанол Р* (10:90).

α-Амилаза. *1100800.* 1,4-*α* -D-Глюкан-глюкано-гидролаза. (ЕС *3.2.1.1).*
Порошок от белого до светло-коричневого цвета.

α-Амилазы раствор. *1100801.*

Раствор *α -амилазы Р с* активностью 800 ФАЕ (франко-американских единиц)/г.

Амилацетат. Амиловый эфир уксусной кислоты. $CH_3COOC_5H_{11}$. *(М.м.* 130,19). Бесцветная прозрачная жидкость с фруктовым запахом.

н-Амиловый спирт. См. *Пентанол.*

***трет*-Амиловый спирт.** См. *трет-Пентиловый спирт.*

Аминоазобензол. $C_{12}H_{11}N_3$. *(М.м.* 197,2). *1003200.* [60-09-3]. Цветной индекс №11000. 4-(Фенилазо)анилин.

Игольчатые кристаллы коричневато-жёлтого с голубоватым оттенком цвета. Мало растворим в воде, легко растворим в 96% спирте и эфире.
Температура плавления: около 128°С.

4-Аминобензойная кислота. $C_7H_7NO_2$. *(М.м.* 137,1). *1003300.* [150-13-0].
Кристаллический порошок белого цвета. Мало растворима в воде, легко растворима в 96% спирте, практически нерастворима в петролейном эфире.

Температура плавления: около 187°С.

Хроматография. Определение проводят, как указано в статье *Прокаина гидрохлорид;* на хроматограмме должно обнаруживаться только одно основное пятно.

Хранят в защищённом от света месте.

4-Аминобензойной кислоты раствор. *1003301.*

1 г *кислоты 4-аминобензойной Р* растворяют в смеси 18 мл *кислоты уксусной безводной Р,* 20 мл *воды* Р и 1 мл *кислоты фосфорной Р.*

Непосредственно перед использованием полученный раствор смешивают с *ацетоном Р* (2:3).

2-Аминобензойная кислота. $C_7H_7NO_2$. *(М.м.* 137,1). *1003400.* [118-92-3]. Антраниловая кислота.

Кристаллический порошок от белого до бледно-жёлтого цвета. Умеренно растворима в холодной воде, легко растворима в горячей воде, 96% спирте, эфире

и глицерине. Растворы в 96% спирте или эфире и в особенности в глицерине обнаруживают фиолетовую флуоресценцию.

Температура плавления: около 145°С.

Аминобутанол. $C_4H_{11}NO$. *(М.м.* 89,1). *1003500.* [5856-63-3]. 2-Аминобутанол.

Маслянистая жидкость. Смешивается с водой, растворим в 96% спирте.

d_{20}^{20}: около 0,94.

n_D^{20}: около 1,453

Температура кипения: около 180°С.

6-Аминогексановая кислота. $C_6H_{13}NO_2$. *(М.м.* 131,2). *1103100.* [60-32-2].

6-Аминокапроновая кислота.

Бесцветные кристаллы. Легко растворима в воде, умеренно растворима в метаноле, практически нерастворима в этаноле.

Температура плавления: около 205°С.

Аминогидроксинафталинсульфоновая кислота.
$C_{10}H_9N0_4S$. *(М.м.* 239,3). *1112400.* [116-63-2]. 4-Амино-3-гидрокси-нафталин-1-сульфоновая кислота.
Игольчатые кристаллы белого или серого цвета, под действием света приобретают розовый цвет, в особенности, когда влажные. Практически не растворима в воде, 96% спирте и эфире, растворима в растворах гидроксидов щелочных металлов и горячих растворах натрия метабисульфита.

Хранят в защищённом от света месте.

Аминогидроксинафталинсульфоновой кислоты раствор. *1112401.*

Смешивают 5,0 г *натрия сульфита безводного Р,* 94.3 г *натрия гидросульфита* Р и 0,7 г кислоты *аминогидроксинафталинсульфоновой Р.* 1,5 г полученной смеси растворяют в *воде Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 10,0 мл.

Срок годности раствора 1 сут.

Аминогиппуровая кислота. $C_9H_{10}N_2O_3$. *(М.м.* 194,2). *1003700.* [61-78-9].

(4-Аминобензамидо)уксусная кислота.

Порошок белого или почти белого цвета. Умеренно растворима в воде, растворима в 96% спирте, очень мало растворима в эфире.

Температура плавления: около 200°С.

Аминогиппуровой кислоты реактив. *1003701.*

3 г *кислоты фталевой Р* и 0,3 г *кислоты аминогиппуровой Р* растворяют в *96% спирте Р и* доводят объем раствора тем же растворителем до 100 мл.

6-Аминокапроновая кислота. См. *6-Аминогексановая кислота.*

Аминометилализариндиуксусная кислота. $C_{19}H_{15}NO_8,2H_2O$. *(М.м.* 421,4). *1003900.* [3952-78-1].
2,2'-[(3,4-дигидроксиантрахинон-3-ил)метилен-нитрило]диуксусной кислоты дигидрат.

Мелкокристаллический порошок от светлого коричневато-жёлтого до оранжево-коричневого цвета. Практически нерастворима в воде, растворима в растворах гидроксидов щелочных металлов.

Температура плавления: около 185°С.

Потеря в массе при высушивании (2.2.32). Не более 10,0%. Определение проводят из 1,000 г.

Аминометилализариндиуксусной кислоты раствор. *1003902.*

0,192 г *кислоты аминометилализариндиуксусной Р* растворяют в 6 мл свежеприготовленного *1 М раствора натрия гидроксида,* прибавляют 750 мл *воды Р,* 25 мл *сукцинатного буферного раствора рН 4,6 Р* и по каплям *0,5 М раствор кислоты хлористоводородной* до изменения окраски раствора от фиолетово-красной до жёлтой (рН от 4,5 до 5), затем прибавляют 100 мл *ацетона Р* и доводят объем раствора *водой* Р до 1000 мл.

Аминометилализариндиуксусной кислоты реактив. *1003901.*

Раствор I. 0,36 *г церия(III) нитрата Р* растворяют в *воде Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 50 мл.

Раствор II. 0,7 г *кислоты аминометилализариндиуксусной Р* суспендируют в 50 мл *воды Р,* прибавляют до растворения около 0,25 мл *раствора аммиака концентрированного Р,* затем прибавляют 0,25 мл *кислоты уксусной ледяной Р и* доводят объем раствора *водой Р* до 100 мл.

Раствор III. 6 *г натрия ацетата Р* растворяют в 50 мл *воды Р,* прибавляют 11,5 мл *кислоты уксусной ледяной Р* и доводят объем раствора *водой* Р до 100 мл.

К 33 мл *ацетона* Р прибавляют 6,8 мл раствора III, 1,0 мл раствора II, 1,0 мл раствора I и доводят объем полученного раствора *водой Р* до 50 мл.

Испытание на чувствительность. К 1,0 мл *эталонного раствора фторида (10 ppm F) Р* прибавляют 19,0 мл воды Р и 5,0 мл реактива аминометилализариндиуксусной кислоты. Через 20 мин должно появиться голубое окрашивание.

Срок годности раствора 5 сут.

Аминонитробензофенон. $C_{13}H_{10}N_2O_3$. *(М.м.* 242,2). *1004000.* [1775-95-7].

2-Амино-5-нитробензофенон.

Кристаллический порошок жёлтого цвета. Практически нерастворим в воде, растворим в тетрагидрофуране, мало растворим в метаноле.

Температура плавления: около 160°С.

$A_{1см}^{1\%}$: от 690 до 720. Определение проводят при длине волны 233 нм, используя раствор 0,01 г/л в *метаноле Р.*

Аминопиразолон.$C_{11}H_{13}N_3O$. *(М.м.* 203,2). *1004600.* [83-07-8]. 4-Амино-2,3-диметил-1-фенилпиразолин-5-он.

Игольчатые кристаллы или порошок светло-жёлтого цвета. Умеренно растворим в воде, легко растворим в 96% спирте, мало растворим в эфире.

Температура плавления: около 108°С.

Аминопиразолона раствор. *1004601.* Раствор 1 г/л в *буферном растворе рН 9.0 Р.*

Аминополиэфир. $C_{18}H_{36}N_2O_6$. *(М.м.* 376,5). *1112500.* [23978-09-8].

4,7,13,16,21,24-гексаокса-1, 10-диазабицикло[8,8,8]гексакозан.

Температура плавления: от 70°С до 73°С.

3-Аминопропанол. C_3H_9NO. *(М.м.* 75,1). *1004400.* [156-87-6]. 3-Аминопропан-1-ол.

Прозрачная, бесцветная, вязкая жидкость.

d_{20}^{20}: около 0,99

n_D^{20}: около 1,461

Температура плавления: около 11°С.

3-Аминопропионовая кислота. $C_3H_7NO_2$. *(М.м.* 89,1). *1004500.* [107-95-9].

b -Аланин.

Содержит не менее 99% $C_3H_7NO_2$.

Кристаллический порошок белого цвета. Легко растворима в воде, мало растворима в 96% спирте, практически нерастворима в ацетоне и эфире.
Температура плавления: около 200°С с разложением.

Аминоуксусная кислота. См*. Глицин.*

4-Аминофенол. C_6H_7NO. *(М.м.* 109,1). *1004300.* [123-30-8].

Кристаллический порошок белого цвета или слегка окрашенный, под действием воздуха и света приобретает окраску. Умеренно растворим в воде, растворим в этаноле.

Температура плавления: около 186°С с разложением.

Хранят в защищённом от света месте.

Аминохлорбензофенон. $C_{13}H_{10}ClNO$. *(М.м.* 231,7). *1003600.* [719-59-5].

2-Амино-5- хлорбензофенон.

Кристаллический порошок желтого цвета. Практически нерастворим в воде, легко растворим в ацетоне, растворим в 96% спирте.
Температура плавления: около 97°С.

Хроматография. Определение проводят, как указано в статье *Хлордиазэпоксида гидрохлорид,* используя 5 мкл раствора 0,5 г/л в *метаноле Р;* на хроматограмме должно обнаруживаться только одно основное пятно с R_f около 0,9.

Хранят в защищённом от света месте.

Аммиака раствор концентрированный. NH_3. *(М.м. 17,03*). *1004700.*

Прозрачная, бесцветная, очень щелочная жидкость. Смешивается с *водой Р* и *96% спиртом Р*.
Аммиака раствор концентрированный содержит не менее 25,0% и не более 30,0% (*м/м*) аммиака NH_3.

d_{20}^{20}: от 0,892 до 0,910.

Аммиака раствор. *1004701.*

Содержит не менее 170 г/л и не более 180 г/л NH_3 (*М.м.* 17,03).
67 г *раствора аммиака концентрированного Р* доводят *водой* Р до объёма 100 мл.
d^{20}_{20}: от 0.931 до 0.934

Аммиака раствор Р, используемый в испытании на предельное содержание железа, должен выдерживать следующее дополнительное требование: 5 мл *раствора аммиака* Р выпаривают на водяной бане досуха. К сухому остатку прибавляют 10 мл *воды Р, 2* мл раствора 200 г/л *кислоты лимонной Р,* 0.1 мл *кислоты тиогликолевой Р* и *раствора аммиака* Р до щелочной реакции, доводят

объём полученного раствора *водой Р* до 20 мл. Раствор не должен окрашиваться в розовый цвет.
Хранят при температуре ниже 20°С, защищая от углерода диоксида.

Аммиака раствор разведенный Р1. *1004702.*

Содержит не менее 100 г/л и не более 104 г/л NH_3 *(М.м.* 17,03).

41 г *раствора аммиака концентрированного Р* доводят *водой Р* до объёма 100 мл.

Аммиака раствор разведенный Р2. *1004703.*

Содержит не менее 33 г/л и не более 35 г/л NH_3 *(М.м.* 17,03).

14 *г раствора аммиака концентрированного Р* доводят *водой* Р до объёма 100 мл.

Аммиака раствор разведенный Р3. *1004704.*

Содержит не менее 1,6 г/л и не более 1,8 г/л NH_3 (*М. м.* 17,03).
0,7 г *раствора аммиака концентрированного Р* доводят *водой Р до* объёма 100 мл.

Аммиака раствор концентрированный Р1. 1004800.

Содержит не менее 32,0*% (м/м)* NH_3 *(Мм.* 17,03).

Прозрачная, бесцветная жидкость.

d_{20}^{20}*:* от 0,883 до 0,889.
Количественное определение. 50,0 мл *1 М раствора кислоты хлористоводородной* помещают в колбу с притертой пробкой, точно взвешивают, прибавляют 2 мл раствора аммиака концентрированного и снова взвешивают. Титруют */ М раствором натрия гидроксида,* используя в качестве индикатора 0,5 мл *смешанного раствора метилового красного Р.*

1 мл *1 М раствора кислоты хлористоводородной* соответствует 17,03 мг NH_3.

Хранят при температуре не выше 20°С, защищая от углерода диоксида.

Аммиака водно-спиртовой раствор. 1 мл *аммиака раствора концентрированного Р* смешивают с 9 мл *96% спирта Р.*

Аммония ацетат. $C_2H_7N0_2$. *(М.м.* 77,1). *1004900.* [631-61-8].

Бесцветные кристаллы, очень легко расплывающиеся на воздухе. Очень легко растворим в воде и 96% спирте.

Хранят в воздухонепроницаемом контейнере.

Аммония ацетата раствор. *1004901.*

150 г *аммония ацетата Р* растворяют в *воде Р,* прибавляют 3 мл *кислоты уксусной ледяной Р* и доводят объём раствора *водой* Р до 1000 мл.

Срок годности 7 сут.

Аммония ванадат. NH_4VO_3. *(М.м.* 117,0). *1006800.* [7803-55-6].

Аммония триоксованадат(V).

Кристаллический порошок от белого до слегка желтоватого цвета. Мало растворим в воде, растворим *к растворе аммиака разведенном Р1.*

Аммония ванадата раствор. *1006801.*

1.2 г *аммония ванадата Р* растворяют в 95 мл *воды Р* и доводят объём раствора *кислотой серной Р до* 100 мл.

Аммония ванадата раствор Р1.

0,05 г *аммония ванадата Р* растворяют в 10 мл *кислоты серной Р*.

Аммония гидрокарбонат. NH_4HCO_3. *(М.м.* 79,1). *1005500.* [1066-33-7].

Содержит не менее 99% NH_4HCO_3.

Аммония дигидрофосфат. $(NH_4)H_2PO_4$. *(М.м.* 115,0). *1005400.* [7722-76-1]. Аммония фосфат однозамещенный.

Кристаллический порошок белого цвета или бесцветные кристаллы. Легко растворим в воде.

pH (2.2.3). Около 4,2. Измеряют рН раствора 23 г/л.

***(1R)-(-)-* Аммония 10-камфоросульфонат.**
$C_{1O}H_{19}N0_4S$. *(Мм.* 249,3). *1103200.*

Содержит не менее 97,0% (1/R)-(-)-аммония 10-камфоросульфоната.
$[a]_D^{20}$:-18°±2°. Определение проводят, используя раствор 50 г/л в *воде Р*

Аммония карбонат. *1005200.* [506-87-6].

Смесь аммония гидрокарбоната (NH_4HC0_3, *М.м.* 79,1) и аммония карбамата (NH_2COONH_4, *М.м.78,1)* в различных количественных соотношениях.

Полупрозрачная масса белого цвета. Медленно растворим примерно в четырех частях воды. Разлагается в кипящей воде.

Аммония карбонат в свободном состоянии выделяет не менее 30% *(м/м)* NH_3 *(М.м.*-17,03).

Количественное определение. 2,00 г аммония карбоната растворяют в 25 мл *воды Р,* медленно прибавляют 50,0 мл 1 *М раствора кислоты хлористоводородной* и титруют *1 М раствором натрия гидроксида,* используя в качестве индикатора 0,1 *мл раствора метилового оранжевого Р.*

1 мл 1 М *раствора кислоты хлористоводородной* соответствует 1,.03 мг NH_3.

Хранят при температуре не выше 20°С.

Аммония карбоната раствор. *1005201.*

Раствор 158 г/л.

Аммония карбонат Р1. Аммоний углекислый. $(NH_4)_2CO_3$. (*М.м. 96,09*).

Бесцветные мелкие кристаллы, в массе белого цвета.

Аммония карбоната раствор Р1. 10 г *аммония карбоната Р1* растворяют в 30 мл *воды Р*, прибавляют 10 мл *аммиака раствора Р1* и доводят объем раствора *водой Р* до 100 мл.

Аммония молибдат. $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$,$4H_2O$. *(М.м.* 1236). *1005700.* [12054-85-2].

Бесцветные кристаллы или кристаллы от слегка желтоватого до зеленоватого цвета. Растворим в воде, практически нерастворим в 96% спирте.

Аммония молибдата раствор. *1005702.*

Раствор 100 г/л.

Хранят в контейнерах оранжевого стекла. Срок годности 6 мес.

Амония молибдата раствор Р2. *1005703.*

5,0 г *аммония молибдата* Р растворяют при нагревании в 30 мл *воды Р* затем охлаждают и доводят РН до 7,0 *раствором аммиака разведенным Р2,* объём полученного раствора доводят *водой Р до* 50 мл.

Аммония молибдата раствор Р3. *1005704.*

Раствор I. 5 г *аммония молибдата Р* растворяют при нагревании в 20 мл *воды Р.*

Раствор II. Смешивают 150 мл *96% спирта Р* со 150 мл *воды Р.* При охлаждении прибавляют 100 мл *кислоты серной Р.*

Непосредственно перед использованием к раствору *I* прибавляют раствор *II* в соотношении 20:80.

Аммония молибдата раствор Р4. *1005705.*

1,0 г *аммония молибдата Р* растворяют в *воде Р,* доводят тем же растворителем до объема 40 мл, прибавляют 3 мл *кислоты хлористоводородной* Р, 5 мл *кислоты хлорной Р* и доводят объем раствора *ацетоном Р* до 100 мл.

Хранят в защищённом от света месте. Срок годности 1 мес.

Аммония молибдата раствор Р5. *1005706.*

1,0 г *аммония молибдата Р* растворяют в 40,0 мл 15% раствора *(об/об) кислоты серной Р.*

Срок годности 1 сут.

Аммония молибдата раствор в серной кислоте. Реактив Фреде. 0,1 г *аммония молибдата Р* растворяют в 10 мл *кислоты серной Р*.

Хранят в контейнерах оранжевого стекла. Срок годности 6 мес.

Аммония молибдата раствор в азотной кислоте. Растворяют 6,5 г *мелкораздробленной молибденовой кислоты Р* в смеси 14 мл *воды Р* и 14,5 мл *аммиака раствора концентрированного Р*. Раствор охлаждают и постепенно при перемешивании прибавляют к смеси 32 мл охлажденного раствора *азтной кислоты Р* и 40 мл *воды Р* и оставляют на 48 ч, затем раствор фильтруют через плотный фильтр. Если при хранении раствора выделяется осадок, его отделяют декантацией.

Аммония молибдата реактив. *1005701.*

Последовательно смешивают по 1 объему раствора 25 г/л *аммония молибдата Р,* раствора 100 г/л *кислоты аскорбиновой Р* и раствора 294,5 г/л (H_2SO_4) *кислоты серной Р,* затем прибавляют 2 объема *воды Р.*

Срок годности 1 сут.

Аммония молибдата реактив Р1. *1005706.*

Смешивают 10 мл раствора 60 г/л *динатрия арсената Р,* 50 *мл раствора аммония молибдата Р,* 90 мл *кислоты серной разведенной Р* и доводят объем раствора *водой Р* до 200 мл.

Смесь выдерживают при температуре 37°C в течение 24 ч.

Хранят во флаконах оранжевого стекла.

Аммония нитрат. NH_4NO_3. (*М.м.* 80,0). *1005800.* [6484-52-2].

Кристаллический порошок белого цвета или бесцветные кристаллы. Гигроскопичен, очень легко растворим в воде, легко растворим в метаноле, растворим в 96% спирте.

Хранят в воздухонепроницаемом контейнере.

Аммония нитрат Р1. *1005801.*

Должен выдерживать требования для *аммония нитрата Р* и следующие дополнительные испытания.

Кислотность (2.2.4). Раствор должен иметь слабо кислую реакцию.

Хлориды (2.4.4). Не более 0,01% (100 ppm). 0,50 г должны выдерживать испытание на хлориды.

Сульфаты (2.4.13). Не более 0,015% (150 ppm). 1,0 г должен выдерживать испытание на сульфаты.

Сульфатная зола (2.4.14). Не более 0,05%. Определение проводят из 1,0 г.

Аммония оксалат. $C_2H_8N_2O_4,H_2O$. *(М.м.* 142,1). *1005900.* [6009-70-7].

Бесцветные кристаллы. Растворим в воде.

Аммония оксалата раствор. *1005901.* Раствор 40 г/л. # 4 г *аммония оксалата Р* растворяют при нагревании в *воде Р* и доводят объем раствора *водой Р* до 100 мл, раствор фильтруют.

Аммония персульфат. $(NH_4)_2S_2O_8$. *(М.м.* 228,2). *1006000.* [7727-54-0].

Кристаллический порошок или гранулы белого цвета. Легко растворим в воде.

Аммония пирролидиндитиокарбамат. $C_5H_{12}N_2S_2$. *(М.м.* 164,3). *1006200.* [5108-96-3]. Аммония 1-пирролидинилдитиоформат.

Кристаллический порошок от белого до светло-жёлтого цвета. Умеренно растворим в воде, очень мало растворим в 96% спирте.

Хранят в контейнере, содержащем небольшое количество аммония карбоната в полотняном мешочке.

Аммония рейнекат. $NH_4[Cr(NCS)_4(NH_3)_2],H_2O$. *(М.м.* 354,4). *1006300.* [13573-16-5]. Аммония диаминтетракис(изотиоцианато)хромат(III) моногидрат.

Порошок или кристаллы красного цвета. Умеренно растворим в холодной воде, растворим в горячей воде и 96% спирте. # В водном растворе разлагается с выделением свободного цианистого водорода (осторожно!).

Аммония рейнеката раствор. *1006301.*

Раствор 10 г/л.

Готовят непосредственно перед использованием.

Аммония роданид. См. *Аммония тиоцианат.*

Аммония сульфамат. $NH_2SO_3NH_4$. *(М.м.* 114,1). *1006400.* [7773-06-0].

Кристаллический порошок белого цвета или бесцветные кристаллы. Гигроскопичен, очень легко растворим в воде, мало растворим в 96% спирте.

Температура плавления: около 130°C.

Хранят в воздухонепроницаемом контейнере.

Аммония сульфат. $(NH_4)_2SO_4$. (М.м. 132,1). *1006500.* [7783-20-2].

Бесцветные кристаллы или гранулы белого цвета. Очень легко растворим в воде, практически не растворим в ацетоне и 96% спирте.

pH (2.2.3). От 4,5 до 6,0. Измеряют pH раствора 50 г/л в *воде, свободной от углерода диоксида, Р. Сульфатная зола (2.4.14).* Не более 0,1%.

Аммония тиоцианат. # Аммония роданид. NH_4SCN. *(М.м.* 76,1). *1006700.* [1762-95-4].

Бесцветные кристаллы, расплывающиеся на воздухе. Очень легко растворим в воде, растворим в 96% спирте.

Хранят в воздухонепроницаемом контейнере.

Аммония тиоцианата раствор. *1006701.*

Раствор 76 г/л.

Аммония формиат. CH_5NO_2. *(М.м.* 63,1). *1112600.* [540-69-2].

Расплывающиеся кристаллы или гранулы. Очень легко растворим в воде, растворим в 96% спирте.

Температура плавления: от 119°С до 121°С.

Хранят в воздухонепроницаемом контейнере.

Аммония фосфат. $(NH_4)_2HPO_4$. *(М.м.* 132,1). *1006100.* [7783-28-0].

Диаммония гидрофосфат.

Кристаллы или гранулы белого цвета. Гигроскопичен, очень легко растворим в воде, практически нерастворим в 96% спирте.

pH (2.2.3). Около 8. Измеряют pH раствора 200 г/л. Хранят в воздухонепроницаемом контейнере.

Аммония хлорид. NH_4Cl. *(М.м. 53,49). 1005300.* [12125-02-9].

Кристаллический порошок белого цвета или бесцветные кристаллы. Легко растворим в воде. Аммония хлорид содержит не менее 99,0% и не более 100,5% NH_4Cl, в пересчете на сухое вещество.

Аммония хлорида раствор. *1005301.* Раствор 107 г/л.

Аммония цитрат. $C_6H_{14}N_2O_7$. *(М.м.* 226,2). *1103300.* [3012-65-5].

Диаммония гидроцитрат.

Кристаллический порошок белого цвета или бесцветные кристаллы. Легко растворим в воде, мало растворим *в 96%* спирте.

pH (2.2.3). Около 4,3. Измеряют pH раствора 22.6 г/л.

Аммония церия (IV) нитрат. $(NH_4)_2Ce(N0_3)_6$. *(М.м.* 548,2). *1005000.* [16774-21-3].

Кристаллический порошок оранжево-жёлтого цвета или прозрачные кристаллы оранжевого цвета. Растворим в воде.

Аммония церия (IV) сульфат. $(NH_4)_4Ce(S0_4)_4{\cdot}2H_20$. *(М.м.* 633). *1005100.* [10378-47-9].

Кристаллический порошок или кристаллы оранжевого-жёлтого цвета. Медленно растворим в воде.

Амоксициллина тригидрат. $C_{16}H_{19}N_3O_5S{\cdot}3H_2O$. *(М.м. 419,4). 1103400.*

(2S, 5R,6R)-6-[[(2R)-2-амино-2-(4-гидроксифенил)ацетил]-3,3-диметил-7-оксо-4-тиа-1-азабицикло[3.2.0]гептан-2-карбоновой кислоты.
Кристаллический порошок белого или почти белого цвета. Мало растворим в воде и 96% спирте, практически нерасторим в эфире и жирных маслах. Амоксициллина тригидрат содержит не менее 95,0% и не более 100,5% $C_{16}H_{19}N_3O_5S{\cdot}3H_2O$ в пересчете на безводное вещество.
pH (2.2.3). От 3,5 до 5,5. Измеряют pH раствора 2 г/л в *воде, свободной от углерода диоксида Р*.
Вода (2.5.12). Не менее 11,5% и не более 14,5%. Определение проводят из 1,0 г субстанции.
Сульфатная зола (2.4.14). Не более 1,0%. Определение проводят из 1,0 г субстанции.
Хранят в воздухонепроницаемом контейнере.

Анетол. $C_{10}H_{12}O$. *(М.м.* 148,2). *1006900.* [4180-23-8].

1-Метокси-4-(пропен-1-ил)бензол.

Кристаллическая масса белого цвета при температуре до 20-21°С, при температуре выше 23°С - жидкость. Практически нерастворим в воде, легко растворим в этаноле, эфире, этилацетате и петролейном эфире.

n_D^{25}: около 1,56.

Температура кипения: около 230°С.

Анетол, применяемый в газовой хроматографии, должен выдерживать следующее дополнительное испытание.

Количественное определение. Проводят методом газовой хроматографии *(2.2.28)* в условиях, указанных в статье *Масло анисовое,* используя анетол в качестве испытуемого раствора.

Площадь основного пика, соответствующего транс-анетолу, со временем удерживания около 41 мин, должна быть не менее 99,0% суммы площадей всех пиков.

цис-Анетол. $C_{10}H_{12}O$. *(М.м.* 14,.2). *1007000.* (Z)-1 -Метокси-4-(пропенил-1)бензол.

Кристаллическая масса белого цвета при температуре до 20—21°С, при температуре выше 23°С — жидкость. Практически нерастворим в воде, легко растворим в этаноле, растворим в эфире, этилацетате и петролейном эфире.

n_D^{25}: около 1,56.;

Температура кипения: около 230°С.

цис-Анетол, применяемый в газовой хроматографии, должен выдерживать следующее дополнительное испытание.

Количественное определение. Проводят методом газовой хроматографии *(2.2.28)* в условиях, указанных в статье *Масло анисовое,* используя *цис*-анетол в качестве испытуемого раствора.

Площадь основного пика должна быть не менее 92,0% суммы площадей всех пиков.

n-Анизидин. C_7H_9NO. *(М.м.* 123,2). *1103500.* |104-94-9]. 4-Метоксианилин.

Кристаллы белого цвета. Умеренно растворим воде, растворим в этаноле.

Содержит не менее 97,0% C_7H_9NO.

Вызывает раздражение кожи; сенсибилизатор.
Хранят в защищённом от света месте при температуре от О°С до 4°С.

При хранении n-анизидин темнеет вследствие окисления. Окисленный n-анизидин может быть восстановлен и обесцвечен следующим образом: 20 *г n-анизидина* Р растворяют в 500 *мл воды Р* при температуре 75°С, прибавляют 1 г *натрия сульфита Р и* 10 *г угля активированного Р,* перемешивают в течение 5 мин и фильтруют. Полученный фильтрат охлаждают и отстаивают при температуре около О°С не менее 4 ч, затем фильтруют, полученные кристаллы промывают небольшим количеством *воды Р,* охлажденной до температуры О°*С,* и сушат в вакууме над *фосфора(V) оксидом Р.*

Анилин. C_6H_7N. *(М.м.* 93,1). *1007100.* [62-53-3]. Бензоламин.

Маслообразная, прозрачная, бесцветная или желтоватого цвета жидкость. Растворим в воде, смешивается с 96% спиртом и эфиром. Обращаться с осторожностью.

Температура кипения: от 183°С до 186°С.

d_{20}^{20}: около 1,02.

Хранят в защищённом от света месте.

Анионообменная смола. *1007200.*

Смола в хлоридной форме, содержащая четвертичные аммониевые группы $[CH_2N^+(CH_3)_3]$, присоединенные к полимерной решетке, состоящей из полистирола поперечно-сшитого 2% дивинилбензола. Выпускают в виде гранул, размер которых должен быть указан в частных статьях.

Смолу промывают на стеклянном фильтре (40) *1 М раствором натрия гидроксида* до отрицательной реакции на хлориды в промывном растворе, затем промывают *водой Р до* получения нейтральной реакции в промывной воде. Суспендируют в свежеприготовленной *воде, свободной от аммиака, Р* и защищают от углерода диоксида.

Анионообменная смола сильноосновная. *1026600.*

Гелеобразная смола в ОН -форме, содержащая четвертичные аммониевые группы $[CH_2N^+(CH_3)_3$, тип 1], присоединенные к полимерной решетке, состоящей из полистирола поперечно-сшитого 8% дивинилбензола.

Прозрачные гранулы коричневого цвета. *Размер частиц:* от 0,2 мм до 1,0 мм. *Содержание влаги:* около 50%. *Полная обменная ёмкость:* не менее 1.2 мэкв/мл.

Анионообменная смола сильноосновная для хроматографии. *1112700.*

Смола с четвертичными аммониевыми группами, присоединёнными к решётке латекса поперечносшитого дивинилбензолом.

Анисовый альдегид. $C_8H_8O_2$. *(М.м.* 136,1). *1007300.* [123-11-5].

4-Метоксибензальдегид.

Маслянистая жидкость. Очень мало растворим в воде, смешивается с 96% спиртом и эфиром.

Температура кипения: около 248°С.

Анисовый альдегид, применяемый в газовой хроматографии, должен выдерживать следующее дополнительное испытание.

Количественное определение. Проводят методом газовой хроматографии *(2.2.28)* в условиях, указанных в статье *Масло анисовое,* используя анисовый альдегид в качестве испытуемого раствора.

Площадь основного пика должна быть не менее 99.0% суммы площадей всех пиков.

Анисового альдегида раствор. *1007301.*

Последовательно смешивают 0,5 мл *анисового альдегида Р,* 10 мл *кислоты уксусной ледяной Р,* 85 *мл метанола Р и* 5 мл *кислоты серной Р.*

Анисового альдегида раствор Р1. *1007302.*

10 мл *анисового альдегида Р* смешивают с 90 мл *96% спирта Р,* прибавляют 10 мл *кислоты серной Р и* перемешивают.

Анолит для изоэлектрофокусировки рН от 3 до 5 (0,1 М раствор кислоты глутаминовой и 0,5 М раствор кислоты фосфорной). *1112800.*

К раствору 14,71 г *кислоты глутаминовой Р* в *воде Р,* прибавляют 33 мл *кислоты фосфорной Р* и доводят объём раствора *водой Р до* 1000 мл.

Антимонила калия тартрат. $C_4H_4KO_7Sb \cdot 1/2H_2O$. *(М.м.* 333,9). *1007600.*

Калия аква[тартрато(4-)-0',0^2,O^3]-антимониат(III) полугидрат.

Гранулированный порошок белого цвета или прозрачные бесцветные кристаллы. Растворим в воде и глицерине, легко растворим в кипящей воде, практически не растворим в 96% спирте. Водный раствор имеет слабо кислую реакцию.

Антитромбин III. *1007800.* [90170-80-2].

Антитромбин III выделяют из человеческой плазмы хроматографически с использованием гепарин-агарозной колонки.

Удельная активность должна быть не менее 6 МЕ/мг.

Антитромбина III раствор Р1. *1007801.*

Антитромбин III Р обрабатывают, как указано производителем, и разбавляют *буферным раствором трис(гидроксиметил)аминометана-натрия хлорида рН 7,4 Р* до активности 1 МЕ/мл.

Антитромбина III раствор Р2. *1007802.*

Антитромбин III Р обрабатывают, как указано производителем, и разбавляют *буферным раствором трис(гидроксиметил)аминометана-натрия хлорида рН 7,4 Р* до активности 0,5 МЕ/мл.

Антраниловая кислота. См. *2-Аминобензойная кислота.*

Антрацен. $C_{14}H_{10}$. *(М.м.* 178,2). *1007400.* [120-12-7].

Кристаллический порошок белого цвета. Практически не растворим в воде, мало растворим в хлороформе.

Температура плавления: около 218°С.

Антрон. $C_{14}H_{10}0$. *(М.м.* 194,2). *1007500.* [90-44-8]. 9-(10 Н)-Антраценон.

Кристаллический порошок светло-жёлтого цвета.

Температура плавления: около 155°С.

Апигенин. $C_{15}H_{10}O_5$. *(М.м.* 270,2). *1095800.* [520-36-5]. 4',5,7-Тригидроксифлавон.

Лёгкий порошок желтоватого цвета. Практически не растворим в воде, умеренно растворим в 96% спирте.

Температура плавления: около 310°С с разложением.

Хроматография. Определение проводят, как указано в статье *Цветки римской ромашки,* используя 10 мкл раствора 0,25 г/л в *метаноле Р.* На верхней трети хроматограммы должно обнаруживаться основное пятно с желтовато-зелёной флуоресценцией.

Апигенин-7-глюкозид. $C_{21}H_{20}O_{10}$. *(М.м.* 432,6). *1095900. '*

Лёгкий порошок желтоватого цвета. Практически нерастворим в воде, умеренно растворим в 96% спирте.

Температура плавления: от 198°С до 201°С.

Хроматография. Определение проводят, как указано в статье *Цветки римской ромашки используя* 10 мкл раствора 0,25 г/л в *метаноле Р.* На средней трети хроматограммы должно обнаруживаться основное пятно с желтоватой флуоресценцией.

Апротинин. *1007900.* [9087-70-1]. Полипептид, состоящий из 58 аминокислот. Ингибирует стехиометрическую активность некоторых протеолитических энзимов, таких как химотрипсин, плазмин, трипсин. Активность не менее 3,0 ЕФЕ в мг, рассчитанная на абсолютно сухое вещество.

Аравийская камедь. См. *Гуммиарабик.*

Арабиноза. $C_5H_{|0}O_5$. *(М.м.* 150,1). *1008000.* [87-72-9]. L-(+)-Арабиноза.

Кристаллический порошок белого цвета. Легко растворима в воде.

$[a]_D^{20}$: от + 103° до +105°. Определение проводят, используя раствор 50 г/л в *воде Р,* содержащей около 0,05% NH_3.

Арбутин. $C_{12}H_{16}O_7$.(М.м. 272.3). *1008100.*[497-76-7]. Арбутозид.

4-Гидроксифенил- b -D-глюкопиранозид.

Мелкие, блестящие игольчатые кристаллы белого цвета. Легко растворим в воде, очень легко растворим в горячей воде, растворим в 96% спирте, практически не растворим в эфире.

$[a]_D^{20}$: около —64°. Определение проводят, используя раствор 20 г/л.

Температура плавления: около 200°С.

Хроматография. Определение проводят, как указано в статье *Листья толокнянки,* на хроматограмме должно быть только одно основное пятно.

Аргинин. $C_6H_{14}N_4O_2$. *(М.м. 174,2). 1103600.* [74-79-3].

(S)-2-амино-5-гуанидинопентановой кислоты.

Аргинин содержит не менее 98,5% и не более 101,0% $C_6H_{14}N_4O_2$.

Кристаллический порошок белого или почти белого цвета или бесцветные кристаллы. Легко растворим в воде, очень мало растворим в 96% спирте, практически нерастворим в эфире.

$[a]_D^{20}$: от +25,5°С до +28,5°С. Определение проводят, используя раствор 80 г/л в *кислоте хлористоводородной Р1.*

Хранят в плотно укупоренном контейнере, в защищенном от света месте.

Аргон. Аг. *(А.м.* 39,95). *1008200.* [7440-37-1].

Содержит не менее 99,995% *(об/об)* Аг.

Аскорбиновая кислота. $C_6H_8O_6$. *1008400.* [50-81-7].

(R)-5-[(S)-1,2-дигидроксиэтил]-3,4-дигидрокси-5*Н*-фуран-2-она.

Кислота аскорбиновая содержит не менее 99,0% и не более 100,5% $C_6H_8O_6$.

Кристаллический порошок белого или почти белого цвета или бесцветные кристаллы, изменяющие цвет под действием воздуха и влаги. Легко растворима в воде, растворима в 96% спирте, практически нерастворима в эфире.

Температура плавления: около 190°C с разложением.

pH: от 2,1 до 2,6. Определение проводят используя раствор 50 г/л в *воде, свободной от углерода диоксида.*

$[\alpha]_D^{20}$: от +20,5°C до +21,5°C. Определение проводят, используя раствор 10 г/л в *воде Р*.

Аскорбиновой кислоты раствор. *1008401.*

50 мг *кислоты аскорбиновой Р* растворяют в 0,5 мл *воды Р* и доводят объём раствора *диметилформамидом Р* до 50 мл.

L-Аспартил-L-фенилаланин. $C_{13}H_{16}N_2O_5$. *(М.м.* 280,3). *1008500.* [13433-09-5].

(S)-3-Амино-N-[(S)-1-карбокси-2-фенилэтил]янтарная кислота.

Порошок белого цвета.

Температура плавления: около 210°C с разложением.

Ацеталь. $C_6H_{14}O_2$. *(М.м.* 118,2). *1112300.* [105-57-7]. Ацетальдегидадиэтилацеталь. 1,1-Диэтоксиэтан.

Прозрачная, бесцветная, летучая жидкость. Смешивается с водой и 96% спиртом.

d_{20}^{20}: около 0,824.

n_D^{20}: около 1,382.

Температура кипения: около 103°C.

Ацетальдегид. C_2H_4O. *(М.м.* 44,1). *1000200.* [75-07-0]. Этаналь.

Прозрачная, бесцветная, воспламеняющаяся жидкость. Смешивается с водой и 96% спиртом.

d_{20}^{20} : около 0,788.

n_D^{20}: около 1,332.

Температура кипения: около 21°C.

Ацетальдегидаммиака тримера тригидрат. $C_6H_{15}N_3$, $3H_2O$. *(М.м. 183,3)*. *1133500.* [76231-37-3]. 2,4,6-Триметилгексагидро-1,3,5-триазин тригидрат.

Температура плавления: от 95°C до 97°C.

Ацетилхлорид. C_2H_3ClO. *(М.м.* 78,5). *1000800.* [75-36-5].

Прозрачная, бесцветная, воспламеняющаяся жидкость с резким запахом. Разлагается в воде и 96% спирте, смешивается с этиленхлоридом. Обращаться с осторожностью.

d_{20}^{20}: около 1,10

Температурные пределы перегонки (2.2.11). От 49°C до 53°C; должно перегоняться не менее 95%.

Ацетилирующая смесь. Смешивают 1 ч *уксусного ангидрида Р* и 3 ч *пиридина Р* (точка кипения 115°C). Смесь должна быть бесцветной. Смесь применяют свежеприготовленной. Обращаться с осторожностью.

N-Ацетил-ε-капролактам. $C_8H_{13}NO_2$. *(М.м.* 155,2). *1102700.* [1888-91-1].

N-Ацетилгексан-6-лактам.

Бесцветная жидкость. Смешивается с этанолом.

d_{20}^{20}: около 1.100.

n_D^{20}*:* около 1,489.

Температура кипения: около 135°C.

Ацетилацетамид. $C_4H_7NO_2$. *(М.м.* 101,1). *1102600.* [5977-14-0]. 3-Оксобутанамид.

Температура плавления: от 53°*C* до 56°C.

Ацетилацетон. $C_5H_8O_2$. *(М.м.* 100,1). *1000900.* [123-54-6]. 2,4-Пентандион.

Бесцветная или слегка желтоватого цвета, легко воспламеняющаяся жидкость. Легко растворим в воде, смешивается с ацетоном, 96% спиртом, эфиром и кислотой уксусной ледяной.

n_D^{20}: от 1,452 до 1,453.

Температура кипения: от 138°C до 140°C.

Ацетилацетона реактив PI. *1000901.*

К 100 мл *раствора аммония ацетата Р* прибавляют 0,2 мл *ацетилацетона Р.*

N-Ацетилнейраминовая кислота. $C_{11}H_{19}NO_9$. *(М.м.* 309,3). *1001100.* [131-48-6].

О-Сиаловая кислота.

Игольчатые кристаллы белого цвета. Растворима в воде и метаноле, мало растворима в 96% спирте, практически не растворима в ацетоне и эфире.
$[a]_D^{20}$: около —36°. Определение проводят, используя раствор 10 г/л.

Температура плавления: около 186°C с разложением.

Ацетилтирозина этиловый эфир. $C_{13}H_{17}NO_4 \cdot H_2O$. *(М.м.* 269,3). *1001200.* [36546-50-6]. N-Ацетил-L-тирозина этиловый эфир моногидрат. Этил-(S)-2-ацетамидо-3-(4-гидроксифенил)пропионат моногидрат.

Кристаллический порошок белого цвета; пригоден для количественного определения химотрипсина.

$[a]_D^{20}$: от +21°до +25°. Определение проводят, используя раствор 10 г/л в 96% *спирте Р.*

$A_{1см}^{1\%}$: от 60 до 68. Определение проводят при длине волны 278 нм, в *96% спирте Р.*

Ацетилтирозина этилового эфира 0,2 М раствор. *1001201.*

0,54 г *ацетилтирозина этилового эфира Р* растворяют в *96% спирте Р* и доводят объем раствора тем же растворителем до 10,0 мл.

N-Ацетилтриптофан. $C_{13}H_{14}N_2O_3$. *(М.м.* 246,3). *1102800.* [1218-34-4].

2-Ацетиламино-3-(индол-3-ил)пропионовая кислота.

Порошок белого или почти белого цвета или бесцветные кристаллы. Мало растворим в воде, растворим в разведенных растворах гидроксидов щелочных металлов.

Температура плавления: около 205°С.

Количественное определение. 10,0 мг растворяют в смеси растворителей *ацетонитрил Р - вода Р* (10:90) и доводят объем раствора той же смесью до 100,0 мл. Определение проводят, как указано в статье *Триптофан* в испытании «1,1 '-Этилиден-бис(триптофан) и другие сопутствующие примеси».
Площадь основного пика должна быть не менее 99,0% суммы площадей всех пиков.

Ацетилхолина хлорид. $C_7H_{16}ClNO_2$. *(М.м.* 181,7); *1001000.* [60-31-1].

Кристаллический порошок. Очень легко растворим в холодной воде и 96% спирте, практически нерастворим в эфире; разлагается в горячей воде и растворах щелочей.

Хранят при температуре -20°С.

Ацетилэвгенол. $C_{12}H_{14}O_3$. *(М.м.* 206,2). *1100700.* [93-28-7].

2-Метокси-4-(2-пропенил)фенилацетат.

Маслянистая жидкость жёлтого цвета. Легко растворим в 96% спирте и эфире, практически нерастворим в воде.

n_D^{20} : около 1,521.

Температура кипения: от 281°С до 282°С.

Ацетилэвгенол, применяемый в газовой хроматографии, должен выдерживать следующее дополнительное испытание.

Количественное определение. Проводят методом газовой хроматографии *(2.2.28),* как указано в статье *Масло гвоздичное,* используя ацетилэвгенол в качестве испытуемого раствора.

Площадь основного пика должна быть не менее 98,0% суммы площадей всех пиков.

Ацетон. C_3H_6O. *(М.м. 58,08*). *1000600.* [67-64-1]. Пропан-2-он.

Прозрачная, бесцветная, летучая жидкость. Смешивается с водой, 96% спиртом и эфиром. Пары огнеопасны.

d_{20}^{20} : от 0,790 до 0,793.

Вода (2.5.12). Не более 3 г/л. Определение проводят из 10,0 мл субстанции полумикрометодом, используя в качестве растворителя 20 мл *пиридина безводного Р.*

Хранят в защищенном от света месте.

Ацетон безводный.

Ацетон Р сушат над *натрия сульфатом безводным Р* в течение 12 ч.

Ацетонитрил. C_2H_3N. *(М.м.* 41,05). *1000700.* [75-05-8]. Метилцианид. Этаннитрил.

Прозрачная, бесцветная жидкость. Смешивается с водой, ацетоном, эфиром и метанолом.

d_{20}^{20}: около 0,78.

n_D^{20}: около 1,344.

Раствор 100 г/л ацетонитрила имеет нейтральную реакцию по лакмусовой бумаге.

Температурные пределы перегонки (2.2.11). От 80°C до 82°C; должно перегоняться не менее 95%.

Ацетонитрил, используемый для спектрофотометрии, должен выдерживать следующее дополнительное испытание.

Минимальное пропускание (2.2.25). 98%. Определение проводят в области длин волн от 255 нм до 420 нм, используя в качестве компенсационной жидкости *воду Р.*

Ацетонитрил для хроматографии. *1000701.* См. *Ацетонитрил.*

Ацетонитрил, используемый в хроматографии, должен выдерживать следующие дополнительные испытания.

Минимальное пропускание (2.2.25). 98%. Определение проводят при длине волны 240 нм, используя в качестве компенсационной жидкости *воду Р.*

Минимальная чистота (2.2.28). 99.8%.

Ацетонитрил для хроматографии Р1. *1000702.*

Должен выдерживать требования для *ацетонитрила Р* и следующие дополнительные требования.

Содержит не менее 99,9% C_2H_3N.

Оптическая плотность (2.2.25). Не более 0,10. Измеряют при длине волны 200 нм, используя в качестве компенсационной жидкости *воду Р*

Барбалоин. $C_{21}H_{22}O_9 \cdot H_2O$. *(М.м.* 436,4). *1008800.* [1415-73-2]. Алоин. 1,8-Дигидрокси-3-гидроксиметил-10- b -D-глюкопиранозил-10Н-антрацен-9-он.

Кристаллический порошок или игольчатые кристаллы от жёлтого до темно-жёлтого цвета, под действием воздуха и света темнеет. Умеренно растворим в воде и 96% спирте, растворим в ацетоне, растворах аммиака и гидроксидов щелочных металлов, очень мало растворим в эфире.

$A_{1см}^{1\%}$: около 192 - при длине волны 269 нм;

около 226 - при длине волны 296,5 нм;

около 259 - при длине волны 354 нм.

Определение проводят, используя в качестве растворителя *метанол Р,* в пересчете на безводное вещество.

Хроматография. Определение проводят, как указано в статье *Кора крушины;* на хроматограмме должно обнаруживаться только одно основное пятно.

Барбитал. $C_8H_{12}N_2O_3$. *(М.м.* 184,2). *1008900.* [57-44-3].

5,5-диэтилпиримидин-2,4,6(1*H*,3*H*,5*H*)-трион.

Содержит не менее 99,0% и не более 101,0% $C_8H_{12}N_2O_3$ в пересчете на сухое вещество.

Белый кристаллический порошок или бесцветные кристаллы. Мало растворим в воде, растворим в кипящей воде, 96% спирте и эфире. Образует водорастворимые соединения с едкими щелочами, карбонатами и аммиаком.

Барбитал-натрий. $C_8H_{11}N_2NaO_3$. *(М.м.* 206,2). *1009000.* [144-02-5].

Содержит не менее 98,0*%.* 5,5-диэтил-1Н,3Н,5Н-пиримидин-2,4,6-триона натрия. Кристаллический порошок белого цвета или бесцветные кристаллы. Легко растворим в воде, мало растворим в 96% спирте, практически нерастворим в эфире.

Барбитуровая кислота. $C_4H_4N_2O_3$. *(М.м.* 128,1). *1009100.* [67-52-7].

1Н,3Н,5Н-Пиримидин-2,4,6-трион.

Порошок белого или почти белого цвета. Мало растворима в воде, легко растворима в кипящей воде и разведенных кислотах.

Температура плавления: около 253°С.

Бария гидроксид. $Ba(OH)_2 \cdot 8H_2O$. *(М.м.* 315,5). *1009400.* [12230-71-6]. Бария дигидроксид.

Бесцветные или белые кристаллы. Растворим в воде. Ядовит.

Бария гидроксида раствор. *1009401.* Раствор 47,3 г/л. *Бария гидроксид Р* взбалтывают с *водой, свободной от углерода диоксида Р*. Ядовит.

Бария карбонат. $BaCO_3$. *(М.м.* 197,3). *1009200.* [513-77-9].

Порошок белого цвета или рассыпчатая масса. Практически нерастворим в воде.

Бария нитрат. $Ba(NO_3)_2$. *(М.м.* 261,35). Барий азотнокислый.

Бесцветные кристаллы. Ядовит.

Бария нитрата раствор.

Раствор *бария нитрата Р* 50 г/л. Ядовит.

Бария сульфат. $BaSO_4$. *(М.м.* 233,3). *1009500.* [7727-43-7].

Мелкий порошок, тяжелый, белого цвета, свободный от крупных частиц. Практически нерастворим в воде и органических растворителях. Лчень мало растворим в кислотах и растворах гидроксидов тяжелых металлов.

Бария хлорид. $BaCl_2 \cdot 2H_2O$. *(М.м.* 244,3). *1009300.* [10326-27-9]. Бария дихлорид.

Бесцветные кристаллы. Легко растворим в воде, мало растворим в 96% спирте. Ядовит.

Бария хлорида раствор Р1. *1009301.* Раствор 61 г/л.

Бария хлорида раствор Р2.*1009302.* Раствор 36.5 г/л.

Бензальдегид. C_7H_6O. *(М.м.* 106,1). *1009600.* [100-52-7].

Бесцветная или слегка желтоватого цвета жидкость. Мало растворим в воде, смешивается с 96% спиртом и эфиром.

d_{20}^{20}: около 1,05.

n_D^{20}: около 1,545.

Температурные пределы перегонки (2.2.11). От 177°С до 180°С; должно перегоняться не менее 95%.

Хранят в защищённом от света месте.

Бензальдегида раствор насыщенный. 1 мл *бензальдегида Р* взбалтывают в склянке с 250 мл *воды Р*. Смесь оставляют до следующего дня, время от времени взбалтывая. Перед применением сливают прозрачную жидкость. Раствор применяют свежеприготовленным.

Бензидин. $NH_2C_6H_4{\cdot}C_6H_4NH_2$. *(М.м.* 184,24). 4,4'-диаминодифенил.
Белые или слегка желтоватые мелкоигольчатые кристаллы. Обращаться с осторожностью.

Бензил. $C_{14}H_{10}O_2$. *(М.м.* 210.2). *1117800.* [134-81-6]. Дифенилэтандион.

Кристаллический порошок желтоватого цвета. Нерастворим в воде, растворим в 96% спирте, этилацетате и толуоле.

Температура плавления: 95°С.

Бензилбензоат. $C_{14}H_{12}O_2$. *(М.м.* 212.2). *1010800.* [120-51-4]. Фенилметилбензоат.

Содержание не менее 99,0% и не более 100,5% $C_{14}H_{12}O_2$.

Бесцветные или почти бесцветные кристаллы или бесцветная или почти бесцветная маслянистая жидкость. Практически нерастворим в воде, смешивается с 96% спиртом, эфиром, метиленхлоридом, жирными и эфирными маслами.

Температура кипения: около 320°С.

Хранят в воздухонепроницаемом, максимально наполненном контейнере, в защищенном от света месте.

Бензилкоричный эфир. $C_{16}H_{14}O_2$. *(М.м.* 238,3). *1010900.* [103-41-3].

Бензил-3-фенилпроп-2-еноат. Бензилциннамат.

Бесцветные или желтоватого цвета кристаллы. Практически нерастворим в воде, растворим в 96% спирте и эфире.

Температура плавления: около 39°С.

Бензиловый спирт. C_7H_8O. (*М.м.* 108,1). *1010700.* [100-51-6]. Фенилметанол.

Содержит не менее 98,0% и не более 100,5% C_7H_8O.

Бесцветная, прозрачная, маслянистая жидкость. Растворим в воде, смешивается с 96% спиртом, жирными и эфирными маслами.

d_{20}^{20}: от 1,043 до 1,049.

Показатель преломления (2.2.1). От 1,538 до 1,541.

Хранят в воздухонепроницаемом контейнере, под азотом, в защищенном от света месте, при температуре от 2°С до 8°С.

Бензилпенициллина натриевая соль. $C_{16}H_{17}N_2NaO_4S$. (*М.м.* 356,4). *1011000.* [69-57-8]. Натрия (2S,5R,6R)-3,3-диметил-7-оксо-6-[(фенилацетил)амино]-4-тиа-1-азабицикло[3.2.0]гептан-2-карбоксилат.

Содержит не менее 96,0% и не более 101,0% $C_{16}H_{17}N_2NaO_4S$.

Кристаллический порошок белого или почти белого цвета. Очень легко растворим в воде, практически нерастворим в жирных маслах и вазелиновом масле.

pH (*2.2.3*). От 5,5 до 7,5 раствора 100 г/л в *воде, свободной от углерода диоксида Р*. $[\alpha]_D^{20}$: от +285° до +310° в пересчете на сухое вещество. 0,500 г субстанции растворяют в *воде, свободной от углерода диоксида Р* и доводят объем раствора тем же растворителем до 25,0 мл.

Оптическая плотность (2.2.25). 90,0 мг субстанции растворяют в воде Р и доводят объем раствора тем же растворителем до 50,0 мл. Измеряют оптическую плотность полученного раствора при длинах волн 325 нм, 280 нм и 264 нм (максимум), разбавив раствор, при необходимости, для измерения при длине волны 264 нм. Оптическая плотность при длинах волн 325 нм и 280 нм должна быть не более 0,10; при длине волны 264 нм (максимум) должна быть от 0,80 до 0,88, в пересчете на неразведенный (1,80 г/л) раствор. Проверяют разрешающую способность прибора (*2.2.25*); отношение оптических плотностей должно быть не менее 1,7.

Потеря в массе при высушивании (2.2.32). Не более 1,0%. 1,000 г субстанции сушат при температуре от 100°С до 105°С.

2-Бензилпиридин. $C_{12}H_{11}N$. (*М.м.* 169,2). *1112900.* [101-82-6].

Содержит не менее 98,0% $C_{12}H_{11}N$.

Жидкость жёлтого цвета.

Температура плавления: от 13°С до 16°С.

Бензилхлорид. C_7H_7Cl. (*М.м.* 169,2). [95-49-8]. 2-хлортолуол.

Бесцветная, слезоточивая жидкость, растворима в эфире, разлагаемая водой и спиртом.

d_{20}^{20}: около 1,082.

n_D^{20}: около 1,52.

Точка кипения: около 197°С.

Бензоиларгинина этилового эфира гидрохлорид.
$C_{15}H_{23}ClN_4O_3$ *(М.м.* 342,8). *1010500.* [2645-08-1]. N-Бензоил-L-аргинин этилового эфира гидрохлорид. Этил(S)-2-бензамидо-5-гуанидиновалерата гидрохлорид.

Кристаллический порошок белого цвета. Очень легко растворим в воде и этаноле, практически не растворим в эфире.

$[\alpha]_D^{20}$: от —15° до—18°. Определение проводят, используя раствор 10 г/л.

Температура плавления: около 129°С.

$A_{1см}^{1\%}$: от 310 до 340. Определение проводят при длине волны 227 нм, используя раствор 0,01 г/л.

N-Бензоил-L-пролил-L-фенилаланил-L-аргинина 4-нитроанилида ацетат. $C_{35}H_{42}N_8O_8$. *(М.м.* 703). *1010600.*

Бензоилхлорид. C_7H_5ClO. *(М.м.* 140,6). *1010400.* [98-88-4].

Бесцветная, слезоточивая жидкость. Растворим в эфире, разлагается в воде и 96% спирте.

d_{20}^{20}: около 1,21.

Температура кипения: около 197°С.

Бензоин. $C_{14}H_{12}O_2$. *(М.м.* 212,3). *1010200.* [579-44-2].

2-Гидрокси-1,2-дифенилэтанон.

Кристаллы слегка желтоватого цвета. Очень мало растворим в воде, легко растворим в ацетоне, растворим в горячем 96% спирте, умеренно растворим в эфире.

Температура плавления: около 137°С.

Бензойная кислота. $C_7H_6O_2$. *(М.м.* 122,1). *1010100.* [65-85-0]. Бензолкарбоновая кислота.

Кристаллический порошок белого цвета или бесцветные кристаллы, без запаха или со слабым специфическим запахом. Мало растворима в воде, растворима в кипящей воде, легко растворима в 96% спирте, эфире и жирных маслах.

Содержит не менее 00,0% и не более 100,5% $C_7H_6O_2$.

Бензол. C_6H_6. *(М.м.* 78,1). *1009800.* [71-43-2].

Прозрачная, бесцветная, воспламеняющаяся жидкость. Практически не растворим в воде, смешивается с 96% спиртом и эфиром.

Температура кипения: около 80°С.

Бензофенон. $C_{13}H_{10}O$. *(М.м.* 182,2). *1010300.* [119-61 -9]. Дифенилметанон.

Кристаллы в виде призм. Практически не растворим в воде, легко растворим в 96% спирте и эфире.

Температура плавления: около 48°С.

1,4-Бензохинон. $C_6H_4O_2$. *(М.м.* 108,1). *1118500.* [106-51 -4].

Циклогекса-2,5-диен-1,4-дион.

Содержит не менее 98.0% $C_6H_4O_2$.

Бензэтония хлорид. $C_{27}H_{42}ClNO_2,H_2O$. *(М.м.* 466,1). *1009900.* [121-54-0]. Бензилдиметил[2-[2-[4-(1,1,3,3-тетраметилбутил)фенокси]этокси]этил]-аммония хлорид моногидрат.

Мелкий порошок белого цвета или бесцветные кристаллы. Растворим в воде и 96% спирте, мало растворим в эфире.

Температура плавления: около 163°С.

Хранят в защищённом от света месте.

Бергаптен. $C_{12}H_8O_4$. *(М.м.* 216,2). *1103700.* [484-20-8]. 5-Метоксипсорален.

Бесцветные кристаллы. Практически не растворим в воде, умеренно растворим в 96% спирте и мало растворим в кислоте уксусной ледяной.

Температура плавления: около 188°С.

Бетулин. $C_{30}H_{50}O_2$. *(М.м.* 442,7). 1011100. [473-98-3]. Луп-20(39)-ен-3β,28-диол.

Кристаллический порошок белого цвета.

Температура плавления: от 248°С до 251°С.

Бисбензимид. $C_{25}H_{27}Cl_3N_6O,5H_2O$. *(М.м.* 624). *1103800.* [23491-44-3].

4-[5-[5-(4-Метилпиперазин-1-ил)бензимидазол-2-ил]бензимидазол-2-ил]фенола тригидрохлорид пентагидрат.

Бисбензимида исходный раствор. *1103801.*

5 мг *бисбензимида Р* растворяют в *воде Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 100 мл.

Хранят в темном месте.

Бисбензимида рабочий раствор. *1103802.*

Непосредственно перед использованием 100 мкл *исходного раствора бисбензимида Р* доводят *фосфатным забуференным физиологическим раствором рН 7,4 Р до* объёма 100 мл.

Биурет. $C_2H_5N_3O_2$. *(М.м.* 103,1). *1011600.* [108-19-0].

Кристаллы белого цвета, гигроскопичны. Растворим в воде, умеренно растворим в 96% спирте, очень мало растворим в эфире.

Температура плавления: от 188°С до 190°С с разложением.

Хранят в воздухонепроницаемом контейнере.

Биуретовый реактив. *1011601.*

1,5 г *меди (II) сульфата* Р и 6.О г *калия-натрия тартрата Р* растворяют в 500 мл *воды Р,* прибавляют 300 мл раствора 100 г/л *натрия гидроксида Р,* свободного от карбонатов, доводят объём раствора тем же растворителем до 1000 мл и перемешивают.

Бифенил-4-ол. $C_{12}H_{10}O$. *(М.м.* 170,2). *1011300.* [90-43-7]. 4-Фенилфенол.

Кристаллический порошок белого цвета. Практически нерастворим в воде.

Температура плавления: от 164°С до 167°С.

Бора фторид. BF_3. *(М.м.* 67,8). *1012100.* [7637-07-2]. Бора трифторид.

Бесцветный газ.

Бора фторида раствор в метаноле. *1012101.*

Раствор 140 г/л в *метаноле Р.*

Бора хлорид. BCl_3. *(М.м.* 117,2). *1112000.* [10294-34-5]. Бора трихлорид.

Бесцветный газ. Бурно реагирует с водой. Используют в виде растворов в подходящих растворителях (2-хлорэтанол, метиленхлорид, гексан, гептан, метанол).

Токсичен, вызывает коррозию.

Температура кипения: около 12,6°С.

n_D^{20} : около 1,420.

Бора хлорида раствор в метаноле. *1112001.* Раствор 120 г/л в *метаноле Р.*

Хранят в защищённом от света месте при температуре -20°С, преимущественно в ампулах.

Борная кислота. H_3BO_3. *(М.м.*61,8). *1011800.* [10043-35-3].

Кристаллический порошок или кристаллы белого цвета, или бесцветные, блестящие, жирные на ощупь пластинки. Растворима в воде, 96% спирте, легко растворима в кипящей воде и глицерине (85%).

Содержит не менее 99,0% и не более 100,5% H_3BO_3.

pH: от 3,8 до 4,8. 3,3 г субстанции растворяют в 80 мл кипящей *воды дистиллированной Р*, охлаждают и доводят объем раствора *водой, свободной от углерода диоксида Р* до 100 мл.

Борнеол. $C_{10}H_{18}O$. *(М.м.*154,3). *1011900.* [507-70-0].

эндо-1,7,7-Триметилбицикло[2.2.1]гептан-2-ол.

Бесцветные кристаллы. Легко сублимируется, практически нерастворим в воде, легко растворим в 96% спирте, эфире и петролейном эфире.

Температура плавления: около 208°С.

Хроматография. Определение проводят методом тонкослойной хроматографии *(2.2.27),* используя в качестве тонкого слоя *силикагель G*P. На линию старта хроматографической пластинки наносят 10 мкл раствора 1 г/л в *толуоле Р.* Хроматографируют в *хлороформе Р.* Когда фронт растворителя пройдет 10 см от линии старта, пластинку вынимают из камеры, сушат на воздухе и опрыскивают *раствором анисового альдегида Р,* расходуя 10 мл на пластинку площадью 200 мм^2, сушат при температуре от 100°С до 105°С в течение 10 мин. На хроматограмме должно обнаруживаться только одно основное пятно.

Борнилацетат. $C_{12}H_{20}O_2$. *(М.м.* 196,3). *1012000.* [5655-61-8].

эндо-1,7,7-Триметилбицикло[2.2.1]-гепт-2-ил ацетат.

Бесцветные кристаллы или бесцветная жидкость. Очень мало растворим в воде, растворим в 96% спирте и эфире.

Температура плавления: около 28°С.

Хроматография. Определение проводят методом тонкослойной хроматографии *(2.2.27),* используя в качестве тонкого слоя *силикагель GP.* На линию старта хроматографической пластинки наносят 10 мкл раствора 2 г/л в *толуоле Р.* Хроматографируют в *хлороформе Р.* Когда фронт растворителя пройдет 10 см, пластинку вынимают из камеры, сушат на воздухе и опрыскивают *раствором анисового альдегида Р,* расходуя 10 мл на пластинку площадью 200 мм^2, сушат при температуре от 100°С до 105°С в течение 10 мин. На хроматограмме должно обнаруживаться только одно основное пятно.

Бриллиантовый синий. *1012200.* [6104-59-2]. См. *Кислотный синий 83.*

Бром. Br_2. *(М.м.* 159,8). *1012400.* [7726-95-6].

Дымящаяся жидкость коричневато-красного цвета. Мало растворим в воде, растворим в 96% спирте и эфире.

d_{20}^{20}: около 3,1.

Брома раствор. *1012401.*

30 г *брома Р* и 30 г *калия бромида Р* растворяют в *воде Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 100 мл.

Бромная вода. *1012402.*

3 мл *брома* Р встряхивают со 100 мл *воды Р* до насыщения.

Хранят над избытком *брома Р* в защищённом от света месте.

Бромная вода Р1. *1012403.* 0,5 мл *брома Р* встряхивают со 100 мл *воды Р.* Хранят в защищённом от света месте. Срок годности 7 сут.

5-Бром-2'-деоксиуридин.$C_9H_{11}BrN_2O_5$. *(М.м.* 307,1). *1012500.* [59-14-3].

5-Бром-1-(2-деокси-β-D-эритро-пентофуранозил)-1H,3H-пиримидин-2,4-дион.

Температура плавления: около 194°С.

Хроматография. Определение проводят, как указано в статье *Йодоксиуридин;* наносят 5 мкл раствора 0,25 г/л; на полученной хроматограмме должно обнаруживаться только одно основное пятно.

Бромелайны. *1012300.* [37189-34-7].

Концентрат протеолитических ферментов, полученный из *Ananas comosus* Merr. Порошок тускло-жёлтого цвета.

Активность: 1 г бромелайнов должен высвобождать около 1,2 г аминного азота из *раствора желатина Р* в течение 20 мин при температуре 45°С и pH 4,5.

Бромелайнов раствор. *1012301.*

Раствор 10 г/л *бромелайнов* Р в смеси растворителей *фосфатный буферный раствор pH 5,5 Р*-раствор 9 г/л *натрия хлорида Р* (1:9).

Бромистоводородной кислоты 30% раствор. *1098700.* [10035-10-6].

30 % раствор кислоты бромистоводородной в *кислоте уксусной ледяной Р.*

Перед вскрытием содержимое осторожно дегазируют.

Бромистоводородная кислота разведенная. *1098701.*

5,0 мл *30% раствора кислоты бромистоводородной Р* помещают во флаконы из тёмного стекла, укупоривают в атмосфере *аргона Р* полиэтиленовыми пробками и хранят в защищённом отсвета месте. Непосредственно перед использованием прибавляют 5,0 мл *кислоты уксусной ледяной Р и* перемешивают.

Хранят в темном месте.

Бромистоводородной кислоты 47% раствор. *1118900.*

Раствор 47*% (м/м)* кислоты бромистоводородной в *воде Р.*

Бромистоводородная кислота разведенная Р1.*1118901.*

Содержит 7,9 г/л HBr.

16,81 г *47% раствора кислоты бромистоводородной Р* растворяют в *воде Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 1000 мл.

Бромкрезоловый зелёный. $C_{21}H_{14}Br_4O_5S$. *(М.м.* 698). *1012600.* [76-60-8].

3',3'',5',5''-Тетрабром-м-крезолсульфонфталеин. 4,4'-(3H-2,1-Бензоксатиол-3-илиден)-бис[2,6-дибром-3-метилфенол]S,S'-диоксид.

Порошок белого с коричневатым оттенком цвета. Мало растворим в воде, растворим в 96% спирте и разведенных растворах гидроксидов щелочных металлов.

Бромкрезолового зелёного раствор. *1012601.*

50 мг *бромкрезолового зелёного Р* растворяют в 0,72 мл *0,1 М раствора натрия гидроксида* и 20 мл *96% спирта Р,* доводят объём раствора *водой* Р до 100 мл.

Испытание на чувствительность. К 100мл *воды, свободной от углерода диоксида, Р* прибавляют 0,2 мл раствора бромкрезолового зелёного; появляется

синее окрашивание, которое переходит в жёлтое при прибавлении не более 0,2 мл *0,02 М раствора кислоты хлористоводородной.*

Изменение окраски. От жёлтой до синей в интервале pH 3,6-5,2.

Бромкрезолового зелёного и метилового красного раствор. *1012602.*

0,15 г *бромкрезолового зелёного Р* и 0,1 г *метилового красного* Р растворяют в 180 мл *этанола Р и* доводят объём раствора *водой Р* до 200 мл.

Бромкрезоловый пурпуровый. $C_{21}H_{16}Br_2O_5S$. *(М.м.* 540,2). *1012700.* [115-40-2]. 3',3''-Дибром-о-крезолсульфонфталеин.4,4'-(3Н-2,1-Бензоксатиол-3-илиден)бис-(2-бром-6-метилфенол)S,S-диоксид.

Порошок розоватого цвета. Практически нерастворим в воде, растворим в 96% спирте и разведенных растворах гидроксидов щелочных металлов.

Бромкрезолового пурпурового раствор. *1012701.*

50 мг *бромкрезолового пурпурового* Р растворяют в 0,92 мл *0,1 М раствора натрия гидроксида* и 20 мл *96% спирта Р,* доводят объём раствора *водой Р* до 100 мл.

Испытание на чувствительность. К 100 мл *воды, свободной от углерода диоксида, Р* прибавляют 0,2 мл раствора бромкрезолового пурпурового и 0,05 мл *0,02 М раствора натрия гидроксида;* появляется синевато-фиолетовое окрашивание, которое переходит в жёлтое при прибавлении не более 0,2 мл *0,02 М раствора кислоты хлористоводородной.*

Изменение окраски. От жёлтой до синевато-фиолетовой в интервале pH 5,2-6,8.

Бромтимоловый синий. $C_{27}H_{28}Br_2O_5S$. *(М.м.* 624). *1012900.* [76-59-5].

3',3''-Дибромтимолсульфонфталеин. 4,4'-(3Н-2,1-Бензоксатиол-3-илиден)-бис(2-бром-6-изопропил-3-метилфенол)S,S-диоксид.
Порошок от красновато-розового до коричневатого цвета. Практически не растворим в воде, растворим в 96% спирте и разведенных растворах гидроксидов щелочных металлов.

Бромтимолового синего раствор Р1. *1012901.*

50 мг *бромтимолового синего Р* растворяют в смеси 4 мл *0,02 М раствора натрия гидроксида* и 20 мл *96% спирта Р,* доводят объём раствора водой Р до 100 мл.

Испытание на чувствительность. К 100 мл *воды, свободной от углерода диоксида, Р* прибавляют 0,3 мл раствора бромтимолового синего; появляется жёлтое окрашивание, которое переходит в синее при прибавлении не более 0,1 *мл 0,02 М раствора натрия гидроксида.*

Изменение окраски. От жёлтой до синей в интервале pH 5,8-7,4.

Бромтимолового синего раствор Р2.*1012902*

Раствор 10 *г/л в диметилформамиде Р.*

Бромтимолового синего раствор Р3. *1012903.*

К 0,1 г *бромтимолового синего Р* прибавляют 3,2 мл *0,05 М раствора натрия гидроксида* и 5 мл *спирта (90%, об/об) Р,* нагревают до растворения, полученный раствор охлаждают и доводят *спиртом (90%, об/об) Р* до объёма 250 мл.

BRP индикатора раствор. *1013000.*

0,1 г *бромтимолового синего Р,* 20 мг *метилового красного Р* и 0,2 г *фенолфталеина Р* растворяют в *96% спирте Р,* доводят объём раствора тем же растворителем до 100 мл и фильтруют.

Бромфеноловый синий. $C_{19}H_{10}Br_4O_5S$. *(М.м.* 670). *1012800.* [115-39-9].

3',3'',5',5''-Тетрабромфенолсульфонфталеин. 4,4'-(3Н-2,1-Бензоксатиол-3-илиден)бис(2,6-дибромфенол)S,S-диоксид.

Порошок светлого оранжево-жёлтого цвета. Очень мало растворим в воде, мало растворим в 96% спирте, легко растворим в растворах гидроксидов щелочных металлов.

Бромфенолового синего раствор. *1012801.*

0.1 г бромфенолового синего Р растворяют в смеси 1,5 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида и 20 мл 96% спирта Р, доводят объём раствора водой Р до 100 мл.

Испытание на чувствительность. К 20 мл воды, свободной от углерода диоксида, Р прибавляют 0,05 мл бромфенолового синего и 0,05 мл 0,1 м раствора кислоты хлористоводородной; появляется жёлтое окрашивание, которое переходит в синевато-фиолетовое при прибавлении не более 0,1 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида.

Изменение окраски. От жёлтой до синевато-фиолетовой в интервале pH 2,8-4,4.

Бромфенолового синего раствор Р1. *1012802.*

50 мг *бромфенолового синего Р* растворяют при осторожном нагревании в 3,73 мл *0.02 М раствора натрия гидроксида* и доводят *водой Р* до объёма 100 мл.

Бромфенолового синего раствор Р2. *1012803.*

0,2 г *бромфенолового синего* Р растворяют при нагревании в 3 мл *0,1 М раствора натрия гидроксида* и 10 мл *96% спирта Р,* полученный раствор охлаждают и доводят *96% спиртом Р* до объёма 100 мл.

Бруцин. $C_{23}H_{26}N_2O_4,2H_2O$. *(М.м.* 430,5). *1013100.* [357-57-3].

10,11-Диметоксистрихнин.

Бесцветные кристаллы. Мало растворим в воде, легко растворим в 96% спирте и эфире.

Температура плавления: около 178°С.

Бура. См. *Динатрия тетраборат.*

Буры раствор. *1033601.*

9,55 г *динатрия тетрабората Р* растворяют в *кислоте серной Р* при нагревании на водяной бане и доводят объём раствора той же кислотой до 1л.

1,4-Бутандиол. $C_4H_{10}O_2$. *(М.м.*90,12).

Прозрачная, бесцветная жидкость. Содержит не менее 99% $C_4H_{10}O_2$.

d_{20}^{20}: около 1,017.

n_D^{20}: около 1,52.

Температура кипения: около 121°С.

Бутанол. $C_4H_{10}O$. *(М.м.* 74,1). *1013200.* [71-36-3]. н-Бутанол. 1-Бутанол.

Прозрачная, бесцветная жидкость. Смешивается с 96% спиртом.

d_{20}^{20}: около 0,81.

Температура кипения: от 116°С до 119°С.

2-Бутанол Р1. $C_4H_{10}O$. *(М.м.* 74,1). *1013301.* [78-92-2]. втор-Бутиловый спирт.

Содержит не менее 99,0% $C_4H_{10}O$.

Прозрачная, бесцветная жидкость. Растворим в воде, смешивается с 96% спиртом и эфиром.

d_{20}^{20}: около 0,81.

Температурные пределы перегонки (2.2.11). От 99°С до 100°С; должно перегоняться не менее 95%.

Количественное определение. Проводят методом газовой хроматографии, как указано в статье *Спирт изопропиловый.*

2-Бутанон. См. *Метилэтилкетон.*

Бутиламин. $C_4H_{11}N$. *(М.м.* 73,1). *1013600.* [109-73-9]. 1-Бутанамин.
Перегоняют и используют в течение 1 мес.

Бесцветная жидкость. Смешивается с водой, 96% спиртом и эфиром.

n_D^{20}: около 1,401.

Температура кипения: около 78°С.

трет-Бутиламин. *1100900.* [75-64-9]. См. *1,1-Диметилэтиламин.*

Бутилацетат. $C_6H_{12}O_2$. *(М.м.* 116,2). *1013400.* [123-86-4].

Прозрачная, бесцветная, воспламеняющаяся жидкость. Мало растворим в воде, смешивается с 96% спиртом и эфиром.

d_{20}^{20}: около 0,88.

n_D^{20}: около 1,395.

Температурные пределы перегонки (2.2.11). От 123°С до 126°С; должно перегоняться не менее 95%.

Бутилацетат Р1. *1013401.*

Прозрачная, бесцветная, воспламеняющаяся жидкость. Мало растворим в воде, смешивается с 96% спиртом и эфиром.

d_{20}^{20}: около 0,883.

n_D^{20}: около 1,395.

Бутанол. Не более 0,2%. Определение проводят методом газовой хроматографии.

н-Бутилформиат. Не более,.1%. Определение проводят методом газовой хроматографии.

н-Бутилпропионат. Не более 0,1%. Определение проводят методом газовой хроматографии.

Вода. Не более 0,1%.

Количественное определение. Не менее 99,5% $C_6H_{12}O_2$. Определение проводят методом газовой хроматографии.

Бутилборная кислота. $C_4H_{11}BO_2$. *(М.м.* 101,9). *1013700.* [4426-47-5].

Содержит не менее 98% $C_4H_{11}BO_2$

Температура плавления: от 90°С до 92°С.

трет-Бутилгидроксипероксид. $C_4H_{10}O_2$. *(М.м.* 90,1). *1118000.* [75-91-2].

1,1-Диметилэтилгидроксипероксид.
Воспламеняющаяся жидкость. Растворим в органических растворителях.

d_{20}^{20}: 0,898.

n_D^{20}: 1,401.

Температура плавления: 35°С.

Бутилгидрокситолуол. $C_{15}H_{24}O$. *(М.м.* 220,4). *1013800.* [128-37-0].

2,6-бис(1,1.-диметилэтил)4-метилфенол. Бутилированный гидрокситолуол.

Кристаллический порошок белого или желтовато-белого цвета. Практически нерастворим в воде, очень мало растворим в ацетоне и эфире, легко растворим в 96% спирте и растительных маслах.

Температура затвердевания *(2.2.18)* :От 69°С до 70°С.

Бутилированный гидрокситолуол. *1013800.* [128-37-0].

См. *Бутилгидрокситолуол.*

***трет*-Бутилметиловый эфир.** *1013900.* [1634-04-4].

См. *1,1-Диметилэтилметиловый эфир*

***трет*-Бутиловый спирт.** См. *2-Метил-2-пропанол..*

Бутиловый эфир парагидроксибензойной кислоты. $C_{11}H_{14}O_3$. *(М.м.* 194,2). *1103900.* [94-26-8]. Бутилпарагидроксибензоат. Бутил 4-гидроксибензоат.
Содержание не менее 99,0% и не более 100,5% $C_{11}H_{14}O_3$.
Белый или почти белый кристаллический порошок или бесцветные кристаллы. Очень легко растворим в воде, легко растворим в 96% спирте и метаноле.

Бутиролактон. $C_4H_6O_2$. *(М.м.* 86,1). *1104000.* [96-48-0]. Дигидро-2(3Н)-фуранон.

g -Бутиролактон.

Маслянистая жидкость. Смешивается с водой, растворим в метаноле и эфире.

n_D^{20}: около 1,435.

Температура кипения: около 204°С.

Вазелин. *1062100.*

Полужидкая смесь углеводородов, полученная из нефти и обесцвеченная. Практически нерастворим в воде и 96% спирте, растворим в эфире и *петролейном эфире Р1;* раствор иногда обнаруживает слабую опалесценцию.

Вазелиновое масло. *1062000.* [8042-47-5]. Парафин жидкий.

Вазелиновое масло представляет собой смесь жидких насыщенных углеводородов, полученных из нефти.

Бесцветная, прозрачная, маслянистая жидкость, не флуоресцирует при дневном освещении. Практически нерастворимо в воде, мало растворимо в 96% спирте, смешивается с углеводородами.

Относительная плотность: от 0,827 до 0,890.

Вязкость*:* от 110 мПа·с до 230 мПа·с.

Хранят в защищенном от света месте.

Валериановая кислота. $C_5H_{10}O_2$. *(М.м.* 102,1). *1095200.* [109-52-4]. Пентановая кислота.

Бесцветная жидкость. Растворима в воде, легко растворима в 96% спирте и эфире.

d_{20}^{20} : около 0,94.

n_D^{20} : около 1,409.

Температура кипения: около 186°С.

Ванадиевый ангидрид. См. *Ванадия (V) оксид.*

Ванадия (V) оксид. V_2O_5. *(М.м.* 181,9). *1034000.* [1314-62-1]. Ванадиевый ангидрид. Диванадия пентоксид.

Содержит не менее 98,5% V_2O_5.
Порошок от жёлто-коричневого до оранжевато-коричневого цвета. Мало растворим в воде, растворим в концентрированных минеральных кислотах и растворах гидроксидов щелочных металлов с образованием солей.

Прозрачность (2.2.1). 1 г ванадия(V) оксида нагревают с 10 мл *кислоты серной Р* в течение 30 мин, охлаждают и доводят объём раствора той же кислотой до 10 мл. Раствор должен быть прозрачным.

Чувствительность к водороду пероксиду. 1,0 мл раствора, приготовленного для испытания на прозрачность, осторожно доводят *водой Р* до объёма 50,0 мл (испытуемый раствор). К 0,5 мл испытуемого раствора прибавляют 0,1 мл раствора 0,1 г/л (H_2O_2) *водорода пероксида Р.* Полученный раствор должен иметь чётко выраженную оранжевую окраску в сравнении с окраской контрольного раствора, приготовленного из 0,5 мл испытуемого раствора и 0,1 мл *воды Р.* Оранжевое окрашивание испытуемого раствора должно перейти в оранжево-жёлтое после прибавления 0,4 мл раствора 0,1 г/л (H_2O_2) водорода пероксида.

Потеря в массе после прокаливания. Неболее 1,0%. Определение проводят из 1,00 г при температуре 700°С.

Количественное определение. 0,200 г ванадия (V) оксида растворяют при нагревании в 20 мл раствора 70% *(м/м) кислоты серной Р,* прибавляют 100 мл *воды Р и 0,02 Мраствора калия перманганата* до красноватого окрашивания. Избыток калия перманганата обесцвечивают прибавлением раствора 30 г/л *натрия нитрита Р,* затем прибавляют 5 г *мочевины* Р и 80 мл раствора 70*% (м/м) кислоты серной Р,* охлаждают и немедленно титруют *0,1 М раствором железа сульфата* до зеленовато-красного окрашивания, используя в качестве индикатора 0,1 мл *ферроина Р.*

1 *мл 0,1 М раствора железа сульфата* соответствует 9,095 мг V_2O_5.

Ванадия (V) оксида раствор в кислоте серной. *1034001.*

0,2 г *ванадия (V) оксида Р* растворяют в 4 мл *кислоты серной Р* и доводят объём раствора *водой* Р до 100мл.

Ванилин. $C_8H_8O_3$. *(М.м.* 152,1). *1095300.* [121-35-5].

4-гидрокси-3-метоксибензальдегид.

Содержит не менее 99,0% и не более 101,0% $C_8H_8O_3$ в пересчете на сухое вещество.

Кристаллический порошок или игольчатые кристаллы белого или белого с желтоватым оттенком цвета. Мало растворим в воде, легко растворим в 96% спирте и метаноле, растворим в эфире.

Ванилина реактив. *1095301.*

К 100 мл раствора 10 г/л *ванилина Р* в *96 % спирте Р* осторожно по каплям прибавляют 2 мл *кислоты серной Р.*
Срок годности 2 сут.

 # Ванилина раствор в серной кислоте.

0,1 г *ванилина Р* растворяют в 10 мл *кислоты серной Р*. Раствор применяют свежеприготовленным.

Ванилина раствор в фосфорной кислоте. *1095302.*

1,0 г *ванилина Р* растворяют в 25 мл *96% спирта Р,* прибавляют 25 мл *воды Р* и 35 мл *кислоты фосфорной Р.*

 # Ванилина раствор в хлористоводородной кислоте.

0,2 г *ванилина Р* растворяют в 10 мл *кислоте хлористоводородной* Р. Раствор применяют свежеприготовленным.

 # Ван-Урка реактив. К 35 мл *воды Р* приливают при помешивании 65 мл *кислоты серной Р* и еще в горячий раствор вносят 0,03 мл раствора 100 г/л *железа (III) хлорида Р*. После охлаждения раствора до 50°С прибавляют 0,2 г *диметиламинобензальдегида Р*. Реактив используют через 24 ч после приготовления. Срок годности 7 сут.

Винная кислота. $C_4H_6O_6$. *(М.м.* 150,1). *1087200.* [87-69-4]. Кислота виннокаменная. (2*R*,3*R*)-2,3-дигидроксибутандионовая кислота.

Содержит не менее 99,5% и не более 101,0% $C_4H_6O_6$. В пересчете на сухое вещество.

Кристаллический порошок белого или почти белого цвета или бесцветные кристаллы. Очень легко растворима в воде, легко растворима в 96% спирте.

 # Виннокаменная кислота. См. *Винная кислота.*

Винилацетат. $C_4H_6O_2$. *(М.м.* 86,10). *1111800.* [108-05-4].

d_{20}^{20}: около 0,930.

Температура кипения: около 72°С.

 # Винилмуравьиновая кислота. См. *Акриловая кислота.*

2-Винилпиридин. C_7H_7N. *(М.м.* 105,1). *1102200.* [100-69-6].

Жидкость жёлтого цвета. Смешивается с водой.

d_{20}^{20}: около 0,97.

n_D^{20}: около 1,549.

1-Винилпирролидин-2-он. C_6H_9NO. *(М.м.* 111,1). *1111900.* [88-12-0].

Содержит не менее 99.0% C_6H_9NO.

Прозрачная, бесцветная жидкость.

Вода (2.5.12, полумикрометод). Не более 0,1%. Определение проводят из 2,5 г, используя в качестве растворителя смесь 50 мл *метанола безводного Р и* 10 мл *бутиролактона Р.*

Количественное определение. Проводят методом газовой хроматографии *(2.2.28).*

Хроматографирование проводят на газовом хроматографе с пламенно-ионизационным детектором в следующих условиях:

- колонка кварцевая капиллярная размером 30 м х 0,5 мм, покрытая слоем *макрогола 20 000 Р* толщиной 1,0 мкм.
—газ—носитель *гелий для хроматографии Р;*
—температура блока ввода пробы 190°С;
—температуру колонки программируют следующим образом: выдерживают температуру 80°С в течение 1 мин, затем повышают до 190°С со скоростью 10°С в мин и выдерживают температуру 190°С в течение 15 мин.

Хроматографируют 0,3 мкл испытуемого вещества, регулируя скорость потока газа-носителя таким образом, чтобы время удерживания пика, соответствующего 1-винилпирролидин-2-ону, составляло около 17 мин. Содержание C_6H_9NO определяют методом внутренней нормализации.

Винилполимер октадецилсилильный для хроматографии. *1121600.*

Сферические частицы (5 мкм) сополимера винилового спирта, связанного октадецилсиланом.

Содержит 17% углерода.

Винилхлорид. C_2H_3Cl. *(М.м.* 62,5). *1095400.* [75-01-4].

Бесцветный газ. Мало растворим в органических растворителях.

Висмута нитрат. $Bi(NO_3)_3{\cdot}5H_2O$. *(М.м.* 485,1). Висмут (III) азотнокислый 5-водный.

Прозрачные бесцветные кристаллы белого цвета.

Висмута нитрат основной. $[4BiNO_3(OH)_2,BiO(OH)]$. *(М.м.* 1462). *1011500.* [1304-85-4].

Порошок белого цвета. Практически нерастворим в воде.

Висмута нитрат основной Р1. *1011501.*

Содержит не менее 71,5% и не более 74,0% висмута (Bi), и не менее 14,5%, но не более 16,5% нитрата, в пересчете на азота (V) оксид (N_2O_5).

Висмута нитрата основного раствор. *1011502.*

5 г *висмута нитрата основного Р1* растворяют в смеси 8,4 мл *кислоты азотной Р* и 50 мл *воды Р,* доводят объём раствора *водой Р* до 250 мл и фильтруют, если необходимо.

Кислотность. К 10 мл прибавляют 0,05 *мл раствора метилового оранжевого Р;* окраска раствора должна измениться при прибавлении от 5,0 мл до 6,25 мл *1 М раствора натрия гидроксида.*

Вода. *1095500.* [7732-18-5]. См. статью *Вода очищенная.*

Вода дейтерированная. См. *Дейтерия оксид.*

Вода, свободная от аммиака. *1095501.* [7732-18-5].

К 100 мл *воды Р* прибавляют 0,1 мл *кислоты серной Р,* перегоняют, используя прибор для определения *Температурных пределов перегонки (2.2.11),* отбрасывают первые 10 мл и собирают следующие 50 мл.

Вода, свободная от нитратов. *1095506.* [7732-18-5].

К 100 мл *воды Р* прибавляют несколько миллиграммов *калия перманганата Р и бария гидроксида Р;* перегоняют, используя прибор для определения

Температурных пределов перегонки (2.2.11), отбрасывают первые 10 мл и собирают следующие 50 мл.

Вода, свободная от углерода диоксида. *1095502.* [7732-18-5].

Воду Р кипятят в течение нескольких минут, охлаждают.

Хранят, защищая от атмосферного воздействия.

Вода, свободная от частиц. *1095507.* [7732-18-5].

Воду Р фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,22 мкм.

Вода дистиллированная. *1095504.* [7732-18-5]. *Вода Р,* полученная путём перегонки.

Вода для инъекций. *1095505.* [7732-18-5]. См. статью *Вода для инъекций.*

Вода для хроматографии. *1095503.* [7732-18-5].

Деионизированная *вода Р,* имеющая сопротивление не менее 0,18 Мом·м.

Водород для хроматографии. H_2. *(М.м.* 2.016). *1043700.* [1333-74-0].

Содержит не менее 99.95% (об/об) H_2.

Водорода пероксида раствор концентрированный. H_2O_2. *(М.м.* 34,01). *1043900.* [7722-84-1].
Содержит не менее 29,0% (*м/м*) и не более 31,0% (*м/м*) H_2O_2.
Бесцветная, прозрачная жидкость.
Хранят в защищенном от света месте; если субстанция не содержит стабилизатора, ее хранят при температуре ниже 15°С. Быстро разлагается при контакте с органическими окислителями, некоторыми металлами при подщелачивании.
Если субстанция содержит стабилизатор, это должно быть указано на этикетке.

Водорода пероксида раствор разведенный. *1043800.* [7722-84-1]. Водорода пероксида раствор (3%).
Содержит не менее 2,5% (*м/м*) и не более 3,5% (*м/м*) H_2O_2.
Бесцветная прозрачная жидкость.
Хранят в защищенном от света месте; если субстанция не содержит стабилизатора, ее хранят при температуре ниже 15°С. Быстро разлагается при контакте с органическими окислителями, некоторыми металлами при подщелачивании.
Если субстанция содержит стабилизатор, это должно быть указано на этикетке.

Восстанавливающая смесь. *1074700.*

Для получения однородной смеси последовательно смешивают предварительно измельчённые реактивы: 20 мг *калия бромида* Р, 0,5 г *гидразина сульфата Р* и 5 г *натрия хлорида Р.*

Галактоза. $C_6H_{12}O_6$. *(М.м.* 180,2). *1039700.* [59-23-4]. D-(+)-Галактоза.

Кристаллический порошок белого цвета. Легко растворима в воде.

$[\alpha]_D^{20}$: от +79°до +81°. Определение проводят, используя раствор 100 г/л в *воде Р,* содержащей около 0,05% NH_3.

Галловая кислота. $C_7H_6O_5 \cdot H_2O$. *(М.м.* 188,1). *1039800.* [5995-86-8].

3,4,5-Тригидроксибензойная кислота моногидрат.
Кристаллический порошок или длинные игольчатые кристаллы, бесцветные или слегка желтоватого цвета. Растворима в воде, легко растворима в горячей воде, 96% спирте и глицерине, мало растворима в эфире.

Галловая кислота теряет кристаллизационную воду при температуре 120°С и плавится при температуре около 260°С с разложением.

Хроматография. Определение проводят, как указано в статье *Листья толокнянки;* на хроматограмме должно обнаруживаться только одно основное пятно.

Гарпагозид. $C_{24}H_{30}O_{11}$. *(М.м.* 494,5). *1098600.*

Кристаллический порошок белого цвета, очень гигроскопичен. Растворим в воде и 96% спирте.

Температура плавления: от 117°С до 121°С.

Хранят в воздухонепроницаемом контейнере.

Гвайазулен. $C_{15}H_{18}$. *(М.м.* 198,3). *1041500.* [489-84-9].

1,4-Диметил-7-изопропилазулен.

Кристаллы тёмно-синего цвета или жидкость синего цвета. Очень мало растворим в воде, смешивается с жирными и эфирными маслами и вазелиновым маслом, умеренно растворим в 96% спирте, растворим в растворе 500 г/л кислоты серной и 80% *(м/м)* кислоте фосфорной с образованием бесцветного раствора.

Температура плавления: около 30°С.

Хранят в защищённом от света и воздуха месте.

Гваяковая смола. *1041400.*

Смола, полученная из сердцевины дерева *Guaiacum officinale L.* и *Guaiacum sanctum L.*

Твёрдые, гладкие фрагменты красновато-коричневого или зеленовато-коричневатого цвета, блестят на изломе.

Гексадиметрина бромид. $(C_{13}H_{30}Br_2N_2)_n$. *1042300.* [28728-55-4]. 1,5-Диметил-1,5-диазаундекаметилен полиметобромид. Поли(1,1,5,5-тетраметил-1,5-азония-ундекаметилен дибромид).

Аморфный порошок белого цвета, гигроскопичен. Растворим в воде.

Хранят в воздухонепроницаемом контейнере.

Гексакозан. $C_{26}H_{54}$. *(М.м.* 366.7). *1042200.* [630-01-3].

Бесцветные или белого цвета хлопья.

Температура плавления: около 57°С.

2,2',2",6,6',6"-Гекса(1,1-диметилэтил)-4,4',4"-[(2,4,6-триметил-1,3,5-бензонитрил)трисметилен] трифенол. $C_{54}H_{78}O_3$. *(М.м.* 775). *1042100.*

2,2',2",6,6',6"-Гекса-трет-бутил-4,4',4"-[(2,4,6-триметил-1,3,5 бензонитрил)трисметилен]три-фенол.

Кристаллический порошок. Практически не растворим в воде, растворим в ацетоне, мало растворим в 96% спирте.

Температура плавления: около 244°С.

Гексаметилдисилазан. $C_6H_{19}NSi_2$. *(М.м.* 161,4). *1042400.* [999-97-3].

Прозрачная, бесцветная жидкость.

d_{20}^{20}: около 0,78.

n_D^{20}: около 1,408.

Температура кипения: около 125°С.

Хранят в воздухонепроницаемом контейнере.

Гексаметилентетрамин. $C_6H_{12}N_4$. *(М.м.* 140,2). *1042500.* [100-97-0]. Гексамин. 1,3,5,7-Тетра-аза-трицикло[3.3.1.1^{3,7}] декан.

Бесцветный кристаллический порошок. Очень легко растворим в воде.

Гексамин. См. *Гексаметилентетрамин.*

Гексан. C_6H_{14}. *(М.м.* 86,2). *1042600.* [110-54-3].

Бесцветная, воспламеняющаяся жидкость. Практически нерастворим в воде, смешивается с этанолом и эфиром.

d_{20}^{20}: от 0,659 до 0,663.

n_D^{20}: от 1,375 до 1,376.

Температурные пределы перегонки (2.2.11). От 67°С до 69°С; должно перегоняться не менее 95%.

Гексан, используемый в спектрофотометрии, должен выдерживать следующее дополнительное испытание.

Минимальное пропускание (2.2.25): 97%. Определение проводят в области длин волн от 260 нм до 420 нм, используя в качестве компенсационной жидкости *воду Р.*

Гексиламин. $C_6H_{15}M$. (*М.м.* 101,2). *1042700.* [111-26-2]. Гексанамин.

Бесцветная жидкость. Мало растворим в воде, растворим в 96 % спирте и эфире.

d_{20}^{20} :около 0,766

n_D^{20}: около 1,418.

Температура кипения: от 127°С до 131°С.

Гелий для хроматографии. Не. *(А.м.* 4,003). *1041800.* [7440-59-7].

Содержит не менее 99.995% *(об/об)* Не.

Гемоглобин. *1041700.* [9008-02-0].

Азот. От 15% до 16%.

Железо. От 0,2% до 0,3%.

Потеря в массе при высушивании (2.2.32). Не более 2%.

Сульфатная зола (2.4.14). Не более 1,5%.

Гемоглобина раствор. *1041701.*

2 г *гемоглобина Р* помещают в стакан вместимостью 250 мл, прибавляют 75 мл *кислоты хлористоводородной разведенной Р2* и перемешивают до полного растворения. Доводят рН *(2.2.3) 1 М раствором кислоты хлористоводородной* до 1,6±0,1. Полученный раствор переносят в колбу вместимостью 100 мл с помощью *раствора кислоты хлористоводородной разведенной Р2* и прибавляют 25 мг *тиомерсаля Р.*

Срок годности 1 сут.

Хранят при температуре (5±3)°С; перед использованием снова доводят рН до 1,6.

Гепарин. *1041900.* [9041-08-1]. Гепарин натрий.

Белый или почти белый порошок, умеренно гигроскопичный. Легко растворим в воде.

Гептан. C_7H_{16}. *(М.м.* 100,2). *1042000.* [142-82-5].

Бесцветная, воспламеняющаяся жидкость. Практически нерастворим в воде, смешивается с этанолом и эфиром.

d_{20}^{20}*:* от 0,683 до 0,686.

n_D^{20}: от 1,387 до 1,388.

Температурные пределы перегонки (2.2.11). От 97°С до 98°С; должно перегоняться не менее 95%.

Гераниола ацетат. $C_{12}H_{20}O_2$ *(М.м.* 196,3). *1106500.* [105-87-3].

(E)-3,7-Диметилокта-2,6-диен-1-ил ацетат.

Бесцветная или слабо-жёлтого цвета жидкость, со слабым запахом розы и лаванды.

d_{25}^{25}: от 0,896 до 0,913.

n_D^{15}: около 1,463.

Температура кипения$_{25}$: около 138°С.

Гераниола ацетат, используемый в газовой хроматографии, должен выдерживать следующее дополнительное испытание.

Количественное определение. Проводят методом газовой хроматографии *(2.2.28),* как указано в статье *Масло цветков померанца,* используя гераниола ацетат в качестве испытуемого раствора.

Площадь основного пика должна быть не менее 99,0% суммы площадей всех пиков.

Гиалуронидазы разбавитель. *1043300.*

0,140 г *желатина гидролизованного Р* растворяют при температуре 37°С в 200 мл смеси равных объёмов *фосфатного буферного раствора pH 6,4 Р* и *воды Р.*

Срок годности 2 ч.

Гидразина сульфат. $H_6N_2O_4S$. *(М.м.* 130,1). *1043400.* [10034-93-2].

Бесцветные кристаллы. Умеренно растворим в холодной воде, растворим в горячей воде (50°*С)* и легко растворим в кипящей воде, практически не растворим в 96% спирте.

Мышьяк (2.4.2, метод А). Не более 0,0001% (1 ppm). 1,0 г должен выдерживать испытание на мышьяк.

Сульфатная зола (2.4.14). Не более 0,1%.

Гидразина гидрохлорид. $H_4N_2 \cdot 2HCl$. *(М.м.* 104,96). Гидразин солянокислый.

Белый кристаллический порошок. Ядовит.

Гидрокортизона ацетат. $C_{23}H_{32}O_6$. *(М.м.* 404,5). *1098800.* [50-03-3].

11β,17-дигидрокси-3,20-диоксопрегн-4-ен-21-ил ацетат.

Содержит не менее 97,0% и не более 103,0% $C_{23}H_{32}O_6$. в пересчете на сухое вещество.

Кристаллический порошок белого или почти белого цвета. Практически нерастворим в воде, мало растворим в этаноле и метиленхлориде. Плавится при температуре около 220°С с разложением.

Хранят в защищенном от света месте.

Гидроксиламина гидрохлорид. NH_4ClO. (*М.м.* 69,5). *1044300.* [5470-11-1].

Кристаллический порошок белого цвета. Очень легко растворим в воде, растворим в 96% спирте.

Гидроксиламина раствор спиртовой. *1044301.*

3,5 г *гидроксиламина гидрохлорида Р* растворяют в 95 мл *спирта (60%, об/об) Р*, прибавляют 0,5 мл раствора 2 г/л *метилового оранжевого Р* в *спирте (60%, об/об) Р* и достаточное количество *0,5 М раствора калия гидроксида в спирте (60%, об/об)* до получения чёткого жёлтого окрашивания, доводят *спиртом (60%, об/об)* Р до объёма 100 мл.

Гидроксиламина раствор щелочной. *1044302.*

Непосредственно перед использованием смешивают равные объёмы раствора 139 г/л *гидроксиламина гидрохлорида* и раствора 150 г/л *натрия гидроксида Р.*

Гидроксиламина раствор щелочной Р1.*1044303.*

Раствор А. 12,5 г *гидроксиламина гидрохлорида Р растворяют в метаноле Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 100 мл.

Раствор В. 12,5 г *натрия гидроксида* .Р растворяют в *метаноле Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 100 мл.

Непосредственно перед использованием смешивают равные объемы растворов А и В.

Гидроксиламина гидрохлорида раствор Р2. *1044304.*

2,5 *г гидроксиламина гидрохлорида* Р растворяют в 4,5 мл горячей *воды Р,* прибавляют 40 мл *96% спирта Р,* 0,4 мл *раствора бромфенолового синего Р2* и достаточное количество *0,5 М раствора калия гидроксида спиртового* до зеленовато-жёлтого окрашивания, доводят объём раствора *96% спиртом Р до* 50,0 мл.

Гидроксиламина сульфат. $N_2H_6O_2 \cdot H_2SO_4$. (*М.м.* 164,14). Гидроксиламин сернокислый.

Бесцветные кристаллы.

4-Гидроксибензойная кислота. $C_7H_6O_3$. (*М.м.* 138,1). *1106700.* [99-96-7].

Кристаллический порошок. Очень мало растворима в воде, очень легко растворима в 96% спирте, растворима в ацетоне и эфире.

Температура плавления: от 214 °Сдо215 °С.

4-Гидроксиизофталевая кислота. $C_8H_6O_5$. (*М.м.* 182,1). *1106900.* [636-46-4].

4-Гидроксибензол-1,3-дикарбоновая кислота.

Игольчатые или в виде пластинок кристаллы. Очень мало растворима в воде, легко растворима в 96% спирте и эфире.

Температура плавления: около 314°С с разложением.

Гидроксиметилфурфурол. $C_6H_6O_3$. (*М.м.* 126,1). *1044400.* [67-47-0].

5-Гидроксиметилфурфурол.

Игольчатые кристаллы. Легко растворим в воде, ацетоне и 96% спирте, растворим в эфире.

Температура плавления: около 32°С.

Гидроксинафтолового синего натриевая соль. $C_{20}H_{11}N_2Na_3O_{11}S_3$. *(М.м.* 620). *1044500.* [63451-35-4].

Тринатрия 2,2'-дигидрокси-1,1'-азонафталин-3',4,6'-трисульфонат.

12-Гидроксиолеиновая кислота. *См. Рицинолеиновая кислота.*

12-Гидроксистеариновая кислота. $C_{18}H_{36}O_3$. *(М.м.* 300,5). *1099000.* [106-14-9].

12-Гидроксиоктадекановая кислота.

Порошок белого цвета.
Температура плавления: от 71°С до 74°С.

5-Гидроксиурацил.$C_4H_4N_2O_3$. (*М.м.* 128,1). *1044700.* [496-76-4]. Изобарбитуровая кислота. Пиримидин-2,4,5-триол.

Кристаллический порошок белого цвета.

Температура плавления: около 310°С с разложением.

Хроматография. Определение проводят, как указано в статье *Фторурацил;* на хроматограмме должно обнаруживаться только одно основное пятно с R_f около 0,3.

Хранят в воздухонепроницаемом контейнере.

Гидроксихинолин. C_9H_7NO. *(М.м.* 145,2). *1044600.* [148-24-3]. 8-Гидроксихинолин. Хинолин-8-ол.

Кристаллический порошок белого или желтоватого цвета. Мало растворим в воде, легко растворим в ацетоне, 96% спирте и разведенных минеральных кислотах.

Температура плавления: около 75°С.

Сульфатная зола (2.4.14). Не более 0,05%.

Гидрохинон. $C_6H_6O_2$. *(М.м.* 110,1). *1044100.* [123-31-9]. Бензол- 1,4-диол.

Бесцветные или белого цвета, игольчатые, мелкие кристаллы, темнеющие под действием воздуха и света. Растворим в воде, 96% спирте и эфире.

Температура плавления: около 173*°С.*

Хранят в защищённом от света и воздуха месте.

Гиосциамина сульфат. $C_{34}H_{48}N_2O_{10}S \cdot 2H_2O$. *(М.м.* 713). *1044900.* [620-61-1].

Би[(1*R*,3s,5S)-8-метил-8-азобицикло[3.2.1]окт-3-ил(2S)-3-гидрокси-2-фенилпропаноат]сульфат.

Содержит не менее 98,0% и не более 100,5% $C_{34}H_{48}N_2O_{10}S$ в пересчете на сухое вещество.

Белый кристаллический порошок или бесцветные иголки. Очень легко растворим в воде, умеренно растворим или растворим в 96% спирте, практически нерастворим в эфире.

Температура плавления: около 203°С с разложением.

Гиосцина гидробромид. $C_{17}H_{22}BrNO_4 \cdot 3H_2O$. *(М.м.* 438,3). *1044800.* [114-49-8].

(1R,2R,4S,5S,7s)-9-метил-3-оксо-9-азотрицикло[3.3.1.0^{2,4}]нон-7-ил(2S)-3-гидрокси-2-фенилпропаноат гидробромид.

Содержит не менее 99,0% и не более 101,0% $C_{17}H_{22}BrNO_4$ в пересчете на безводное вещество.

Белый кристаллический порошок или бесцветные кристаллы. Легко растворим в воде и растворим в 96% спирте.

Температура плавления: около 197°C с разложением, определяемая после высушивания под вакуумом в течение 24 ч и затем при температуре 100 °C -105 °C в течение 2 ч.

Гиперозид. $C_{21}H_{20}O_{12}$. *(М.м.* 464,4). *1045000.*

2-(3,4-Дигидроксифенил)-3-B-D-галактопиранозилок-си-5,7-дигидроксихромен-4-он.

Игольчатые кристаллы светло-жёлтого цвета. Растворим в метаноле.

$[a]_D^{20}$: -8,3°. Определение проводят, используя раствор 2 г/л в *пиридине Р.*

Температура плавления: около 240°C с разложением.

Раствор в *метаноле Р* имеет два максимума поглощения *(2.2.25)* при длинах волн 259 нм и 364 нм.

Гипоксантин. $C_5H_4N_4O$. *(М.м.* 136,1). *1045300.* [68-94-0]. 1Н-Пурин-6-он.

Кристаллический порошок белого цвета. Очень мало растворим в воде, умеренно растворим в кипящей воде, растворим в разведенных кислотах и разведенных растворах гидроксидов щелочных металлов, разлагается, не плавясь, при температуре около 150°C.

Хроматография. Определение проводят, как указано в статье *Меркаптопурин;* на хроматограмме должно обнаруживаться только одно основное пятно.

Гипофосфита реактив. *1045200.*

10 г *натрия гипофосфита* Р растворяют при слабом нагревании в 20 мл *воды Р* и доводят объём раствора *кислотой хлористоводородной Р* до 100 мл, отстаивают и декантируют или фильтруют через стекловату.

Гистамина дигидрохлорид. $C_5H_{11}Cl_2N_3$. *(М.м.* 184,1). *1042800.* [56-92-8].

2-(1*H*-имидазол-4-ил)-этанамин дигидрохлорид.

Белый кристаллический порошок или бесцветные кристаллы. Гигроскопичен. Очень легко растворим в воде, растворим в 96% спирте.

Содержит не менее 98,5% и не более 101,0% $C_5H_{11}Cl_2N_3$ в пересчете на высушенное вещество.

Гистамина фосфат. $C_5H_{15}N_3O_8P_2 \cdot H_2O$. *(М.м.* 325,2). *1042900.* [23297-93-0].

2-(1*H*-имидазол-4-ил)-этанамин дифосфат.

Содержит не менее 98,0% и не более 101,0% $C_5H_{15}N_3O_8P_2$·в пересчете на безводное вещество.

Бесцветные, длинные призматические кристаллы. Легко растворим в воде, мало растворим в 96% спирте.

Гистамина раствор. *1042901.*

Раствор 9 г/л *натрия хлорида Р,* содержащий 0,1 мкг/мл гистамина фосфата или гистамина дигидрохлорида в пересчете на гистамин-основание.

Гистидина гидрохлорид моногидрат. $C_6H_{10}ClN_3O_2 \cdot H_2O$. *(М.м.* 209,6). *1043000.* [123333-71-1].

(RS)-2-Амино-3-(имидазол-4-ил)пропионовой кислоты гидрохлорид моногидрат.

Бесцветные кристаллы или кристаллический порошок. Растворим в воде.

Температура плавления: около 250°С с разложением.

Хроматография. Определение проводят, как указано в статье *Гистамина дигидрохлорид;* на хроматограмме должно обнаруживаться только одно основное пят'но.

Гитоксин. $C_{41}H_{64}0_{14}$. *(М.м.* 781). *1040200.* [4562-36-1]. Гликозид *Digitalis purpurea L.* *3β-(0-*2,6-Дидеокси-β-D-рибо-гексопиранозил-(1→4)-0-2,6-дидеокси-β-D-рибо-гексопиранозил-(1→4)-2,6-дидеокси-β-D-рибо-гексопиранозилокси)-14,16β-дигидрокси-5β,14В-кард-20(22)-енолид.
Кристаллический порошок белого цвета. Практически нерастворим в воде и большинстве органических растворителей, растворим в пиридине.

$[a]_D^{20}$: от +20° до +24°. Определение проводят, используя раствор 5 г/л в смеси растворителей *хлороформ Р —метанол Р*(50:50).

Хроматография. Определение проводят, как указано в статье *Листья наперстянки;* на хроматограмме должно обнаруживаться только одно основное пятно.

Гликолевая кислота. $C_2H_4O_3$. *(М.м.* 76,0). *1040800.* [79-14-1].

2-Гидроксиуксусная кислота.

Кристаллы. Растворима в воде, ацетоне, 96% спирте, эфире и метаноле.

Температура плавления: около 80°С.

Гликокол. См*. Глицин.*

Глиоксальгидроксианил. $C_{14}H_{12}N_2O_2$. *(М.м.* 240,3). *1041000.* [1149-16-2]. Глиоксальбис(2-гидроксианил).

Кристаллы белого цвета. Растворим в горячем 96% спирте.

Температура плавления: около 200°С.

Глиоксаля раствор. *1098400.* [107-22-2].

Содержит около 40*% (м/м)* глиоксаля.

Количественное определение. 1,000 г раствора глиоксаля помещают в колбу с притёртой стеклянной пробкой, прибавляют 20 мл раствора 70 г/л *гидроксиламина гидрохлорида Р* и 50 мл *воды Р,* выдерживают в течение 30 мин и титруют *1 М раствором натрия гидроксида* до перехода окраски от красной к зелёной, используя в качестве индикатора 1 мл *смешанного раствора метилового красного Р.* Параллельно проводят контрольный опыт.

1 мл *1М раствора натрия гидроксида* соответствует 29,02 мг глиоксаля ($C_2H_2O_2$).

Глицерин. $C_3H_8O_3$. *(М.м.* 92,1). *1040500.* [56-81-5]. Пропан-1,2,3-триол.

Содержит не менее 98,0% и не более 101,0% $C_3H_8O_3$.

Сиропообразная, маслянистая на очупь, бесцветная или почти бесцветная, прозрачная жидкость. Очень гигроскопична. Смешивается с водой и 96% спиртом, мало растворим в ацетоне, практически нерастворим в эфире, жирных и эфирных маслах.

n_D^{20}: от 1,470 до 1,475.

Хранят в воздухонепроницаемом контейнере.

Глицерин *(85%).* $C_3H_8O_3$. *(М.м.* 92,1). *1040600.* Пропан-1,2,3-триол.

Содержит не менее 83,5% и не более 88,5% $C_3H_8O_3$ (*водный раствор м/м*).

Сиропообразная, маслянистая на очупь, бесцветная или почти бесцветная, прозрачная жидкость. Очень гигроскопична. Смешивается с водой и 96% спиртом, мало растворим в ацетоне, практически нерастворим в эфире, жирных и эфирных маслах.

n_D^{20}: от 1,449 до 1,455.

Глицерина раствор. 33 мл *глицерина Р* разбавляют *водой Р* до 100 мл и прибавляют крупинку *камфоры Р* или одну каплю *жидкого фенола Р*.

Глицин. $C_2H_5NO_2$. *(М.м.* 75,1). *1040700.* [56-40-6]. Гликокол.

2-аминоэтановая кислота. Аминоуксусная кислота.

Содержит не менее 98,5% и не более 101,0% $C_2H_5NO_2$ в пересчете на сухое вещество.

Кристаллический порошок белого цвета. Легко растворим в воде, мало растворим в 96% спирте, практически нерастворим в эфире.

Хранят в плотно укупоренном контейнере.

Глицирретиновая кислота. $C_{30}H_{46}O_4$. *(М.м.* 470,7). *1040900.* [471-53-4]. Глицирретиновая кислота. 12,13-Дидегидро-3β-гидрокси-11-оксоолеан-3О-овая кислота.

Смесь a - и b -глицирретиновых кислот, в которой преобладает b -изомер.

Порошок от белого до желтовато-коричневатого цвета. Практически не растворима в воде, растворима в этаноле и кислоте уксусной ледяной.

$[a_D^{20}]$: от +145° до+ 155°. Определение проводят, используя раствор 10,0 г/л в *этаноле Р.*

Хроматография. Определение проводят методом тонкослойной хроматографии *(2.2.27),* используя в качестве тонкого слоя *силикагель* GF_{254}*Р,* суспензию которого готовят, используя раствор 0,25% *(об/об) кислоты фосфорной Р.* На хроматографическую пластинку наносят 5 мкл раствора 5 г/л кислоты глицирретиновой в смеси равных объемов *хлороформа Р* и *метанола Р.* Хроматографируют в смеси растворителей *метанол Р-хлороформ Р* (5:95). Когда фронт растворителей пройдёт 10 см, хроматограмму просматривают в УФ-свете при длине волны 254 нм. На хроматограмме должно обнаруживаться тёмное пятно *(*R_f около 0,3), соответствующее кислоте b -глицирретиновой, и меньшее пятно *(*R_f около 0,5), соответствующее кислоте a -глицирретиновой. Пластинку опрыскивают *раствором анисового альдегида Р* и нагревают при температуре от 100°С до 105°С в течение 10 мин. Оба пятна должны быть окрашены в

синевато-фиолетовый цвет; между ними допускается наличие меньшего пятна синевато-фиолетового цвета.

Глутаминовая кислота. $C_5H_9NO_4$. *(М.м.* 147,1). *1040400.* [56-86-0].

(S)-2-аминопентан-1,5-дикарбоновая кислота.

Содержит не менее 98,5% и не более 100,5% $C_5H_9NO_4$ в пересчете на сухое вещество.

Кристаллический порошок белого цвета или бесцветные кристаллы. Легко растворима в кипящей воде, практически нерастворима в кислоте уксусной, ацетоне, 96% спирте и эфире.

$[\alpha_D^{20}]$: от +30,5° до+ 32,5° в пересчете на сухое вещество. Определение проводят, используя раствор 100,0 г/л в *1 М растворе кислоты хлористоводородной*. Растворение проводят при слабом нагревании.

Хранят в плотно укупоренном контейнере, в защищенном от света месте.

Глутаровый альдегид. $C_5H_8O_2$. *(М.м.* 100,1). *1098300.* [111-30-8].

Маслянистая жидкость. Растворим в воде.

n_D^{25}: около 1,434.

Температура кипения: около 188°С.

Глюкоза. $C_6H_{12}O_6$. *(М.м.* 180,2). *1025700.* [50-99-7]. D-(+)глюкопираноза. Декстроза.

Кристаллический порошок белого цвета со сладким вкусом. Легко растворима в воде, умеренно растворима в 96% спирте.

$[\alpha_D^{20}]$: от +52,5° до+ 53,3° в пересчете на безводное вещество. 10,0 г субстанции растворяют в 80 мл *воды Р*, прибавляют 0,2 мл *раствора аммиака разведенного Р1*, выдерживают в течение 30 мин и доводят объем раствора *водой Р* до 100,0 мл.

Вода: не более 1,0%. Определение проводят из 0,50 г субстанции полумикрометодом (*2.5.12*).

Хранят в плотно укупоренном контейнере.

Глюкозамина гидрохлорид. $C_6H_{14}ClNO_5$.(М.м. 215,6). *1040300.* [66-84-2].

D-Глюкозамина гидрохлорид.

Кристаллы. Растворим в воде, практически не растворим в эфире.

$[\alpha_D^{20}]$: +100°, снижающееся до +47,5° через 30 мин. Определение проводят, используя раствор 100 г/л в воде Р.

D-Глюкуроновая кислота. $C_6H_{10}O_7$ *(М.м.* 194,1). *1119700.* [6556-12-3].

Содержит не менее 96,0% $C_6H_{10}O_7$, в пересчёте на сухое вещество, высушенное *в вакууме (2.2.32).*

Растворима в воде и 96% спирте. Обнаруживает мутаротацию: $[\alpha]_D^{24}$: +11,7°→+36,3°.

Количественное определение. 0,150 г растворяют при перемешивании в *метаноле безводном Р* и титруют *0,1 М раствором тетрабутиламмония гидроксида* потенциометрически *(2.2.20),* защищая раствор от воздействия углерода диоксида воздуха во время растворения и титрования.

1 мл 0,1 М *раствора тетрабутиламмония гидроксида соответствует* 19,41 мг $C_6H_{10}O_7$.

Гольмия (III) оксид. Ho_2O_3. *(М.м.* 377,9). *1043100.* [12055-62-8]. Дигольмия триоксид.

Порошок желтоватого цвета. Практически нерастворим в воде.

Гольмия перхлората раствор. *1043101.*

Раствор 40 г/л *гольмия (III) оксида Р в* растворе 141 г/л ($HClO_4$) *кислоты хлорной Р.*

Гуанидина гидрохлорид. CH_5N_3HCl. *(М.м.* 95.5). *1098500.* [50-01-1].

Кристаллический порошок. Легко растворим в воде и 96% спирте.

Гуанин. $C_5H_5N_5O$. *(М.м.* 151,1). *1041600.* [73-40-5]. 2-Амино-1,7-дигидро-6Н-пурин-6-он.

Аморфный порошок белого цвета. Практически нерастворим в воде, мало растворим в 96% спирте, растворим в растворах аммиака и разведенных растворах гидроксидов щелочных металлов.

Гуммиарабик. *1000100.* Аравийская камедь.

Почти полностью, но очень медленно (в течение 2 часов) растворим в двойном от его массы объеме воды. На поверхности остаются очень маленькие кусочки растительных частиц. Полученная жидкость бесцветная или желтоватая, плотная, вязкая, клейкая (липкая), просвечивающаяся и имеющая слабо-кислую реакцию по синей лакмусовой бумажке. Практически нерастворим в 96% спирте.

Гуммиарабика раствор. *1000101.*

100 *г гуммиарабика Р* растворяют в 1000 мл *воды Р* при перемешивании механической мешалкой в течение 2 ч. Центрифугируют с ускорением около 2000 g в течение 30 мин до получения прозрачного раствора.

Хранят в полиэтиленовых контейнерах вместимостью около 250 мл при температуре от 0°Сдо-20°С.

Дантрон. $C_{14}H_8O_4$.(*М.м.* 240,2). *1024500.* [117-10-2].

1,8-Дигидроксиантрахин 9(10Н)-он.

Кристаллический порошок оранжевого цвета.

Температура плавления: около 195°С.

 # Деварда сплав. См. *Сплав Деварда.*

Дейтерия оксид. ^2H_2O. *(М.м.* 20,03). *1025300.* [7789-20-0]. Вода дейтерированная.

Степень дейтерирования не менее 99.7%.

d_{20}^{20}: около 1,11.

n_D^{20}: около 1,328.

Температура кипения: около 101°С.

Дейтерированная кислота уксусная. $C_2{}^2H_4O_2$. *(М.м.* 64,1). *1101100.* [1186-52-3]. Тетрадейтероуксусная кислота. Уксусная-d_3 кислота-d.

Степень дейтерирования не менее 99,7%.

d_{20}^{20}: около 1,12.

n_D^{20}: около 1,368.

Температура кипения: около 115°С.

Температура плавления: около 16°С.

Дейтерированный ацетон. $C_3{}^2H_6O$. *(М.м.* 64,1). *1024900.* [666-52-4]. Ацетон-d_6. ($^2H_6$)-Ацетон.

Степень дейтерирования не менее 99,5%.

Прозрачная, бесцветная жидкость. Смешивается с водой, диметилформамидом, этанолом, эфиром и метанолом.

d_{20}^{20}: около 0,87.

n_D^{20}*:* около 1,357.

Температура кипения: около 55°C.

Вода и дейтерия оксид: не более 0,1%.

Дейтерированный диметилсульфоксид. $C_2{}^2H_6OS$. *(М.м.* 84,2). *1025100.* [2206-27-1]. ($^2H_6$)-Диметилсульфоксид. Диметилсульфоксид-d_6

Степень дейтерирования не менее 99,8%.

Вязкая, практически бесцветная, сильно гигроскопичная жидкость. Растворим в воде, ацетоне, этаноле и эфире.

d_{20}^{20}: около 1,18.

Температура плавления: около 20°C.

Вода и дейтерия оксид: не более 0,1%.

Хранят в воздухонепроницаемом контейнере.

Дейтерированный метанол. C^2H_4O. *(М.м.* 36,1). *1025200.* [811-98-3]. ($^2H_4$)-Метанол. Метанол-d_4.

Степень дейтерирования не менее 99,8%.

Прозрачная, бесцветная жидкость. Смешивается с водой, 96% спиртом и метиленхлоридом.

d_{20}^{20}: около 0,888

n_D^{20}: около 1,326

Температура кипения: 65,4°C.

Дейтерированный хлороформ. C^2HCl_3. *(М.м.* 120,4). *1025000.* [865-49-6].

(^2H)-Хлороформ. Хлороформ-d.

Степень дейтерирования не менее 99,7%.

Прозрачная, бесцветная жидкость. Практически нерастворим в воде, смешивается с ацетоном, 96% спиртом и эфиром. Может быть стабилизирован серебряной фольгой.

d_{20}^{20}:около 1,51.

n_D^{20}: около 1,445.

Температура кипения: около 60°C.

Вода и дейтерия оксид: не более 0,05%.

Декан. $C_{10}H_{22}$. *(М.м.* 142,3). *1024600.* [124-18-5].

Бесцветная жидкость. Практически не растворим в воде.

n_D^{20}: около 1,411.

Температура кипения: около 174°C.

Деканол. $C_{10}H_{22}O$. *(М.м.* 158,3). *1024700.* [112-30-1]. н-Дециловый спирт.

Вязкая жидкость, затвердевающая при температуре 6°С. Практически нерастворим в воде, растворим в 96% спирте и эфире.

n_D^{20} : около 1,436.

Температура кипения: около 230°С.

Декстран 2000 синий. *1011700.* [9049-32-5].

Готовят из декстрана, имеющего среднюю молекулярную массу 2 х 10^6, введением полициклического хромофора, окрашивающего вещество в синий цвет. Степень замещения 0,017. Высушивают при замораживании. Быстро и полностью растворяется в *воде Р* и водных солевых растворах.

Раствор 1 г/л в *фосфатном буферном растворе рН 7 Р* имеет максимум поглощения *(2.2.25)* при длине волны 280 нм.

Декстран поперечно-сшитый для хроматографии Р2. *1025500.*

Гранулы шарообразной формы, пригодны для разделения пептидов и белков с молекулярными массами от 15 х 10^2 до 30 х 10^3. Сухие гранулы имеют диаметр от 20 мкм до 80 мкм.

Декстран поперечно-сшитый для хроматографии Р3. *1025600.*

Гранулы шарообразной формы пригодны для разделения пептидов и белков, с молекулярными массами от 4 х 10^3 до 15 х 10^4. Сухие гранулы имеют диаметр от 40 мкм до 120 мкм.

Декстроза. *1025700.* [50-99-7]. См. *Глюкоза.*

2'-Деоксиуридин. $C_9H_{12}N_2O_5$ *(М.м.* 228,2). *1024800.* [951-78-0].

1-(2-Деокси-β-D-эритро-пентофуранозил)-1 Н,3Н-пиримидин-2,4-дион.

Температура плавления: около 165°С.

Хроматография. Определение проводят, как указано в статье *Йодоксиуридин;* наносят 5 мкл раствора 0,25 г/л; на хроматограмме должно обнаруживаться только одно основное пятно.

Диазобензолсульфоновой кислоты раствор Р1. *10265000.*

0,9 г *кислоты сульфаниловой Р* растворяют в смеси 30 мл *кислоты хлористоводородной разведенной Р и* 70 мл *воды* Р. К 3 мл полученного раствора прибавляют 3 мл раствора 50 г/л *натрия нитрита Р,* охлаждают в ледяной бане в течение 5 мин, затем прибавляют 12 мл раствора натрия нитрита, снова охлаждают и доводят *водой Р* до объёма 100 мл. Реактив помещают в ледяную баню. Готовят непосредственно перед использованием, выдерживая в ледяной бане в течение 15 мин.

Диазореактив. 5 мл раствора кислоты сульфаниловой (4,5 г *кислоты сульфаниловой Р* и 45 мл *кислоты хлористоводородной Р* в 500 мл *воды Р*) вносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, поставленную на лед, прибавляют 2,5 мл раствора натрия нитрита 100 г/л. Смесь оставляют на льду в течение 5 мин, затем еще прибавляют 10 мл ратсвора натрия нитрита 100 г/л.

3,3'-Диаминобензидина тетрагидрохлорид. $C_{12}H_{18}Cl_4N_4 \cdot 2H_2O$. *(М.м.* 396,1). *1098000.* [7411-49-6]. 3,3',4,4'-Дифенилтетрамин.

Порошок почти белого или слегка розового цвета. Растворим в воде.

Температура плавления: около 280°С с разложением.

Диатомит. *1025900.* [91053-39-3].

Мелкий гранулированный порошок белого или почти белого цвета, полученный из кремнистых оболочек окаменевших диатомовых водорослей или их осколков. Практически нерастворим в воде, 96% спирте и эфире. Идентифицируют с помощью микроскопа при увеличении х 500.

Диатомит для газовой хроматографии. *1026000.*
Мелкий гранулированный порошок белого или почти белого цвета, полученный из кремнистых оболочек окаменевших диатомовых водорослей или их осколков. Практически нерастворим в воде, 96% спирте и эфире. Идентифицируют с помощью микроскопа при увеличении х 500; очищают посредством обработки *кислотой хлористоводородной Р* и промыванием *водой Р.*

Размер частиц. Не более 5% должно оставаться на сите № 180 и не более 10% должно проходить через сито № 125.

Диатомит для газовой хроматографии Р1.*1026100.*

Мелкий гранулированный порошок белого или почти белого цвета, полученный из кремнистых оболочек окаменевших диатомовых водорослей или их осколков. Практически нерастворим в воде, 96% спирте и эфире. Идентифицируют с помощью микроскопа при увеличении х 500; очищают посредством обработки *кислотой хлористоводородной Р* и промыванием *водой Р.*

Размер частиц. Не более 5% должно оставаться на сите № 250 и не более 10% должно проходить через сито № 180.

Диатомит для газовой хроматографии Р2.*1026200.*

Мелкий гранулированный порошок белого или почти белого цвета, с удельной площадью поверхности около 0.5 $м^2/г$, полученный из кремнистых оболочек окаменевших диатомовых водорослей или их осколков. Практически нерастворим в воде, 96% спирте и эфире. Идентифицируют с помощью микроскопа при увеличении х 500; очищают посредством обработки *кислотой хлористоводородной Р и* промыванием *водой Р.*

Размер частиц. Не более 5% должно оставаться на сите №180. Не более 10% должно проходить через сито №125.

Диатомит силанизированный для газовой хроматографии. *1026300.*

Диатомит для газовой хроматографии Р, силанизированный диметилдихлорсиланом или другими подходящими силанизирующими реагентами.

Диатомит силанизированный для газовой хроматографии Р1. *1026400.*

Получают из измельченного красного огнеупорного кирпича и силанизируют диметилдихлорсиланом или другими подходящими силанизирующими реагентами. Очищают посредством обработки *кислотой хлористоводородной Р и* промыванием *водой Р.*

Дибензил. $C_{14}H_{14}$. *(М.м.* 182,3). *1011200.* [103-29-7]. 1,2-Дифенилэтан.

Кристаллический порошок белого цвета. Практически нерастворим в воде, очень легко растворим в метиленхлориде, легко растворим в ацетоне, растворим в 96% спирте.

Температура плавления: от 50°C до 53°C.

Дибутиловый эфир. $C_8H_{18}O$. *(М.м.* 130,2). *1026700.* [142-96-1].

Бесцветная, воспламеняющаяся жидкость. Практически нерастворим в воде, смешивается с этанолом и эфиром.

d_{20}^{20} : около 0,77.

n_D^{20} : около 1,399.

Не перегоняют, если дибутиловый эфир не выдерживает испытания на пероксиды.

Пероксиды. 8 мл *раствора крахмала* с *калия йодидом* Р помещают в цилиндр с притёртой стеклянной пробкой, вместимостью 12 мл и диаметром около 1.5 см, полностью заполняют испытуемым эфиром, закрывают пробкой и перемешивают. Выдерживают в тёмном месте в течение 30 мин; не должно появляться окрашивание.

Название и концентрация любого добавленного стабилизатора должны быть указаны на этикетке.

Дибутилфталат. $C_{16}H_{22}O_4$. *(М.м.* 278,3). *1026800.* [84-74-2].

Дибутилбензол-1,2-дикарбоксилат.

Прозрачная, бесцветная или слабо окрашенная маслянистая жидкость. Очень мало растворим в воде, смешивается с ацетоном, 96% спиртом и эфиром.

d_{20}^{20}*:* от 1,043 до 1,048.

n_D^{20} : от 1,490 до 1,495.

10,11-Дигидрокарбамазепин. $C_{15}H_{14}N_2O$. *(М.м.* 238.,). *1028900.* [3564-73-6].

10,11-Дигидро-5Н-дибензо[b,f[азепин-5-карбоксамид.

Температура плавления: от 205°С до 210°С.

Дигидроксинафталин. *1029000.* [132-86-5]. См. *1,3-Дигидроксинафталин.*

1,3-Дигидроксинафталин. $C_{10}H_80_2$. *(М.м.* 160,2). *1029000.* [132-86-5].

Нафталин-1,3-диол.

Кристаллический порошок, обычно коричневато-фиолетового цвета. Легко растворим в воде и 96% спирте.
Температура плавления: около 125°С.

2,7-Дигидроксинафталин. $C_{10}H_8O_2$. *(М.м.* 160,2). *1029100.* [582-17-2].

Нафталин-2,7-диол.

Игольчатые кристаллы. Растворим в воде, 96% спирте и эфире.

Температура плавления: около 190°С.

2,7-Дигидроксинафталина раствор. *1029101.*

10 мг 2,*7-дигидроксинафталина* Р растворяют в 100 мл *кислоты серной Р* и выдерживают до обесцвечивания.

Срок годности 2 сут.

Дигитоксин. $C_{41}H_{64}O_{13}$. *(М.м.* 765). *1028800.* [71-63-6].

3β-[(*O*-2,6-дидеокси-β-D-*рибо*-гексопиранозил-(1→4)-*O*-2,6-дидеокси-β-D-*рибо*-гексопиранозил-(1→4)-*O*-2,6-дидеокси-β-D-*рибо*-гексопиранозил)окси]-14-гидрокси-5β,14β-кард-20(22)-энолид.

Содержит не менее 95,0% и не более 103,0% $C_{41}H_{64}O_{13}$.в пересчете на сухое вещество.

Порошок белого или почти белого цвета. Практически нерастворим в воде, легко растворим в смеси равных объемов метанола и метиленхлорида, мало растворим в 96% спирте и метаноле.

Хранят в защищенном от света месте.

Дигитонин. $C_{56}H_{92}O_{29}$. *(М.м.* 1229). *1028700.* [11024-24-1].

3β-[O-β-D-Глюкопиранозил-(1-»3)-0-В-D-галактопиранозил-(1—>2)-0-[В-D-ксилопиранозил-(1→3)]-O-β-D-галактопиранозил-(1→4)-O-β-D-галактопиранозилокси]-(25R)-5a -спиростан-2a , 15β-диол.

Кристаллы. Практически нерастворим в воде, умеренно растворим в этаноле, мало растворим в 96% спирте, практически не растворим в эфире.

Дидодецил-3,3'-тиодипропионат. $C_{30}H_{58}O_4S$. *(М.м.* 5,.8). 1027700. [123-28-4].

Кристаллический порошок белого цвета. Практически нерастворим в воде, легко растворим в ацетоне и петролейном эфире, мало растворим в 96% спирте.

Температура плавления: около 39°С.

Диизобутилкетон. $C_9H_{18}O$. *(М.м.* 142,2). *1029200.* [108-83-8].

Прозрачная, бесцветная жидкость. Мало растворим в воде, смешивается с большинством органических растворителей.

n_D^{20} : около 1,414.

Температура кипения: около 168°С.

Диизопропиловый эфир. $C_6H_{14}O$. *(М.м.* 102,2). *1029300.* [108-20-3].

Прозрачная, бесцветная жидкость. Очень мало растворим в воде, смешивается с 96% спиртом и эфиром.

d_{20}^{20} : от 0,723 до 0,728.
Температура кипения: от 67°С до 69°С.

Не перегоняют, если диизопропиловый эфир не выдерживает испытания на пероксиды.

Пероксиды. 8 мл *раствора крахмала с калия йодидом Р* помещают в цилиндр с притёртой стеклянной пробкой вместимостью 12 мл и диаметром около 1,5 см, полностью заполняют испытуемым эфиром, закрывают пробкой и перемешивают. Выдерживают в тёмном месте в течение 30 мин. Не должно появляться окрашивание.

Название и концентрация любого добавленного стабилизатора должны быть указаны на этикетке.

Хранят в защищённом от света месте.

Дикалия гидрофосфат. K_2HPO_4. *(М.м.* 174,2). *1033000.* [7758-11-4].

Кристаллический порошок белого цвета, гигроскопичен. Очень легко растворим в воде, мало растворим в 96% спирте.

Хранят в воздухонепроницаемом контейнере.

Дикарбоксидина гидрохлорид. $C_{20}H_{26}Cl_2N_2O_6$. (*М.м.* 461,3). *1026900.* [56455-90-4]. 4,4'-[(4,4'-Диаминодифенил-3,3'-диил)диокси]дибутановой кислоты дигидрохлорид.

Диметикон. *1105400.* [9006-65-9].

Прозрачные бесцветные жидкости различной вязкости. Практически нерастворим в воде, от очень легко растворимого до практически нерастворимого в этаноле, смешивается с этилацетатом, с метилэтилкетоном и с толуолом.

Диметиламинобензальдегид. $C_9H_{11}NO$. *(М.м.* 149,2). *1029800.* [100-10-7].

4-Диметиламинобензальдегид. п.-Диметиламинобензальдегид.

Кристаллы белого или желтовато-белого цвета. Растворим в 96% спирте и разведенных кислотах.

Температура плавления: около 74°C.

Диметиламинобензальдегида раствор Р1. *1029801.*

0,2 г *диметиламинобензальдегида Р* растворяют в 20 мл *96% спирта Р,* прибавляют 0,5 мл *кислоты хлористоводородной Р,* полученный раствор встряхивают с *углем активированным Р и* фильтруют. Окраска раствора не должна быть интенсивнее окраски *раствора йода Р3.*

Готовят непосредственно перед использованием.

Диметиламинобензальдегида раствор Р2. *1029802.*

0,2 г *диметиламинобензалъдегида Р* растворяют без нагревания в смеси 4,5 мл *воды Р* и 5,5 мл *кислоты хлористоводородной Р.*

Готовят непосредственно перед использованием.

Диметиламинобензальдегида раствор Р6. *1029803.* # Реактив Оллпорта.

0,125 г *диметиламинобензальдегида Р* растворяют в охлажденной смеси 35 мл *воды Р* и 65 мл *кислоты серной Р,* прибавляют 0,1 мл раствора 50 г/л *железа (III) хлорида Р.*

Перед использованием выдерживают 24 ч в защищённом от света месте.

Хранят при комнатной температуре 7 сут; в холодильнике — в течение нескольких месяцев.

Диметиламинобензальдегида раствор Р7. *1029804.*

1,0 г *диметиламинобензальдегида Р* растворяют в 50 мл *кислоты хлористоводородной Р* и прибавляют 50 мл *96% спирта Р.*

Хранят в защищённом от света месте. Срок годности 1 мес.

Диметиламинобензальдегида раствор Р8. *1029805.*

0,25 г *диметиламинобензалъдегида Р* растворяют в смеси 5 г *кислоты фосфорной Р,* 45 г *воды Р* и 50 г *кислоты уксусной безводной Р.*

Готовят непосредственно перед использованием.

п-Диметиламинобензальдегида раствор в кислоте серной. 1 г *п-диметиламинобензальдегида Р* смачивают 4 каплями *воды Р* и прибавляют 3 мл *кислоты серной Р.*

4-Диметиламинокоричный альдегид. $C_{11}H_{13}NO$. *(М.м.* 175,2). *1029900.* [6203-18-5]. 3-(4-Диметил-аминофенил)проп-2-еналь. 4-Диметиламино-циннамальдегид.

Кристаллы или порошок от оранжевого до оранжево-коричневого цвета. Чувствителен к свету.

Температура плавления: около 138°С.

4-Диметиламинокоричного альдегида раствор. *1029901.*

2 г *4-диметиламинокоричного альдегида Р* растворяют в смеси 100 мл *кислоты хлористоводородной Р1* и 100 мл *этанола Р.* Хранят в прохладном месте. Непосредственно перед использованием раствор разводят этанолом Р в 4 раза.

Хранят в прохладном месте.

Диметиламинонафталинсульфонилхлорид. $C_{12}H_{12}ClNO_2S$. *(М.м.* 269,8). *1030000.* [605-65-2]. 5-Диметиламино-1-нафталинсульфонилхлорид.

Кристаллический порошок жёлтого цвета. Мало растворим в воде, растворим в метаноле.

Температура плавления: около 70°С. Хранят в прохладном месте.

Диметиланилин. $C_8H_{11}N$. *(М.м.* 121,2). *1030100.* [121-69-7]. N, N-Диметиланилин.

Прозрачная, маслянистая жидкость. Свежеперегнанный - почти бесцветный, при хранении темнеет до красновато-коричневого цвета. Практически нерастворим в воде, легко растворим в 96% спирте и эфире.

n_D^{20}: около 1,558.

Температурные пределы перегонки (2.2.11). От 192°С до 194°С; должно перегоняться не менее 95%.

N,N-Диметиланилин. *1030100.* [121-69-7]. См. *Диметиланилин.*

2,6-Диметаланилин. $C_8H_{11}N$. (*М.м.* 121,2). *1030200.* [87-62-7]. 2,6-Ксилидин.

Бесцветная жидкость. Умеренно растворим в воде, растворим в 96% спирте.

d_{20}^{20}: около 0,98.

2,3-Диметиланилин. $C_8H_{11}N$. *(М.м.* 121,2). *1105300.* [87-59-2]. 2,3-Ксилидин.

Жидкость желтоватого цвета. Умеренно растворим в воде, растворим в 96% спирте.

d_{20}^{20}: от 0.993 до 0.995.

n_D^{20}: около 1,569.

Температура кипения: около 224°С.

Диметилацетамид. C_4H_9NO. *(М.м.* 87,1). *1029700.* [127-19-5].

N,N-Диметилацетамид.

Содержит не менее 99,5% C_4H_9NO.

Бесцветная жидкость. Смешивается с водой и большинством органических растворителей.

d_{20}^{20}: около 0,94.

n_D^{20}: около 1,437.
Температура кипения: около 165°С.

Диметилглиоксим. $C_4H_8N_2O_2$. *(М.м.* 116,1). *1030400.* [95-45-4].

2,3-Бутандиондиоксим.

Кристаллический порошок белого цвета или бесцветные кристаллы. Практически нерастворим в холодной воде, очень мало растворим в кипящей воде, растворим в 96% спирте и эфире.

Температура плавления: около 240°С с разложением.

Сульфатная зола (2.4.14). Не более 0,05%.

Диметилглиоксима раствор. 1 г *диметилглиоксима Р* растворяют в 100 мл раствора 50 г/л *натрия гидрокарбоната Р.*

Диметилдециламин. $C_{17}H_{27}N$. *(М.м.* 185,4). *1113500.* [1120-24-7].

N,N - Диметил-дециламин.

Содержит не менее 98,0% *(м/м)* $C_{17}H_{27}N$.

Температура кипения: около 234°С.

Диметилкарбонат. $C_3H_6O_3$. *(М.м.* 90,1). *1119300.* [616-38-6]. Диметиловый эфир угольной кислоты.

Жидкость: Нерастворим в воде, смешивается с 96% спиртом.

d_4^{17}: около 1,065.

n_D^{20}: около 1,368.

Температура кипения: около 90°С.

Диметиловый жёлтый. $C_{14}H_{15}N_3$. *(М.м.* 225,3). *1029600.* [60-11-7]. Показатель Шульца №28. Индекс цветности №11020. 4-(Диметиламино)азобензол. Метиловый жёлтый.

Мелкие кристаллы жёлтого цвета или хлопья жёлтого или оранжевого цвета. Практически не растворим в воде, очень мало растворим в 96% спирте.

Хроматография. Определение проводят методом тонкослойной хроматографии *(2.2.27),* используя в качестве тонкого слоя *силикагель GP.* На хроматографическую пластинку наносят 10 мкл раствора 0,1 г/л в *метиленхлориде Р* и хроматографируют в этом же растворителе, фронт растворителя должен пройти не менее 10 см; на хроматограмме должно обнаруживаться только одно основное пятно.

Хранят в воздухонепроницаемом контейнере.

Диметилового жёлтого и орацетового синего раствор. *1118700.*

10 мг *диметилового жёлтого Р и* 10 мг *орацетового синего В Р* растворяют в 300 мл *метиленхлорида Р.*

N,N-Диметилоктиламин. $C_{10}H_{23}N$. *(М.м.* 157.,). *1030500.* [7378-99-6]. Октилдиметиламин.

Бесцветная жидкость.

d_{20}^{20}: около 0,765.

n_D^{20}: около 1,424.

Температура кипения: около 195°С.

1,3-Диметил-2-имидозолидинон. $C_5H_{10}N_2O$. *(М.м.* 114,2). [80-73-9].

N,N-Диметилэтиленмочевина.

n_D^{20}: около 1,4720.

Температура кипения: около 224°С.

Диметилпиперазин.$C_6H_{14}N_2$. *(М.м.* 114,2). *1030700.* [106-58-1].

1,4-Диметилпиперазин.

Бесцветная жидкость. Смешивается с водой и 96% спиртом.

d_{20}^{20}: около 0,85.

n_D^{20}: около 1,446.

Температура кипения: около 131°С.

Диметилстеариламид. $C_{20}H_{41}NO$. *(М.м.* 311,6). *1030800.* N,N-Диметилстеариламид.

Твердая масса белого или почти белого цвета. Растворим в большинстве органических растворителей, включая ацетон.

Температура плавления: около 51°С.

Диметилсульфоксид. C_2H_6OS. *(М.м.* 78,1). *1029500.* [67-68-5].

Прозрачная, бесцветная, маслянистая, гигроскопичная жидкость. Смешивается с водой и 96% спиртом.

d_{20}^{20}: около 1,10.

Температура кипения: около 189°С.

Вода (2.5.12). Не более 10 г/л.

Диметилсульфоксид, используемый в спектрофотометрии, должен выдерживать требования для диметилсульфоксида Р, но с другим содержанием воды, приведенным ниже, и кроме того должен выдерживать следующие дополнительные испытания.

Минимальное пропускание (2.2.25) определяют, используя в качестве компенсационной жидкости *воду Р:*

10% при длине волны 262 нм,

35% при длине волны 270 нм,
70% при длине волны 290 нм,

98% при длине волны 340 нм и более.

Вода (2.5.12). Не более 0,2% *(м/м).*

Хранят в воздухонепроницаемом контейнере.

Диметилсульфон. $C_2H_6O_2S$. *(М.м.* 94,1). *1030900.* [67-71-0].

Кристаллический порошок белого цвета. Легко растворим в воде, растворим в ацетоне и 96% спирте.

Температура плавления: от 108°С до 110°С.

N,N - Диметилформамида диметилацетат. $C_5H_{13}NO_2$. *(М.м.* 119,2). *1140700.*

[4637-24-5]. 1,1-Диметокситриметиламин.
Прозрачная бесцветная жидкость.
d_{20}^{20}: около 0,896.

n_D^{20} : около 1,396.

Температура кипения: около 103°С.

Диметилтетрадециламин. $C_{16}H_{35}N$. *(М.м.* 241,5). *1031000.*

N,N- Диметилтетрадециламин.

Содержит не менее 98,0*% (м/м)* и не более 101,0*% (м/м)* $C_{16}H_{35}N$.

Прозрачная или почти прозрачная, бесцветная или желтоватого цвета жидкость. Практически нерастворим в воде, смешивается с ацетоном, 96% спиртом и метанолом.

d_{20}^{20}*:* около 0,80.

Температура кипения: около 260°С.

Вода (2.5.12). Не более 0,3*% (м/м).*

Количественное определение. 0,200 г растворяют в 10 мл *96% спирта Р* и титруют *0,1 М раствором кислоты хлористоводородной до* красного окрашивания, используя в качестве индикатора 0,1 мл *раствора метилового красного Р.*

1 мл 0,1 *М раствора кислоты хлористоводородной* соответствует 24,15 мг $C_{l6}H_{35}N$.

2,6-Диметилфенол. $C_8H_{10}O$. *(М.м.* 122,2). *1030600.* [576-26-1].

Бесцветные игольчатые кристаллы. Мало растворим в воде, легко растворим в 96% спирте и эфире.

Температура кипения: около 203°С.

Температура плавления: от 46°С до 48°С.

3,4-Диметюфенол. $C_8H_{10}O$.(*М.м.* 122,2). *1098100.* [95-65-8].

Кристаллы белого или почти белого цвета. Мало растворим в воде, легко растворим в 96% спирте.

Температура кипения: около 226°С.

Температура плавления: от 25°С до 27°С.

Диметилформамид. C_3H_7NO. *(М.м.* 73,1). *1030300.* [68-12-2].

Прозрачная, бесцветная, жидкость. Смешивается с водой и 96% спиртом.

d_{20}^{20} : от 0,949 до 0,952.

Температура кипения: около 153°С.

Вода (2.5.12). Не более 0,1%.

Диметилформамида диэтилацеталь. $C_7H_{17}NO_2$. *(М.м.* 147,2). *1113600.* [1188-33-6]. N,N-диметилформамида диацеталь.

n_D^{20} : около 1,40.

Температура кипения: от 128°С до 130°С.

1,1-Диметилэтиламин. $C_4H_{11}N$. *(М.м.* 73,1). *1100900.* [75-64-9].

2-Амино-2-метил-пропан. *трет*-Бутиламин.

Жидкость. Смешивается с 96% спиртом.

d_{20}^{20} : около 0,694.

n_D^{20} : около 1,378.

Температура кипения: около 46°C.

1,1-Диметилэтилметиловый эфир. $C_5H_{12}O$. *(М.м.* 88,1). *1013900.* [1634-04-4]. *трет*-Бутилметиловый эфир.

Бесцветная, прозрачная, воспламеняющаяся жидкость.

n_D^{20}: около 1,376.

Минимальное пропускание (2.2.25) определяют, используя в качестве компенсационной жидкости *воду Р:*

не менее 50% при длине волны 240 нм,

не менее 80% при длине волны 255 нм,

не менее 98% при длине волны 280 нм.

Диметоксипропан. $C_5H_{12}O_2$. *(М.м.* 104,1). *1105200.* [77-76-9]. 2,2-Диметоксипропан.

Бесцветная жидкость. Разлагается под действием влажного воздуха или воды.

d_{20}^{20}: около 0,847.

n_D^{20}: около 1,378.

Температура кипения: около 83°C.

Димидия бромид. $C_{20}H_{18}BrN_3$. *(М.м.* 380,3). *1031100.* [518-67-2].

3,8-Диамино-5-метил-6-фенилфенантридиния бромид.

Кристаллы тёмно-красного цвета. Мало растворим в воде при температуре 20°C, умеренно растворим в воде при температуре 60°C и 96% спирте, практически нерастворим в эфире.

Димидия бромида и сульфанового синего смешанный раствор. *1031101.*

Отдельно растворяют 0,5 г *димидия бромида Р* и 0,25 г *сульфанового синего* Р в 30 мл горячей смеси растворителей *этанол Р - вода Р (*1:9) и перемешивают. Оба раствора смешивают и доводят объём раствора той же смесью растворителей до 250 мл. 20 мл полученного раствора смешивают с 20 мл раствора 14.0% *(об/об) кислоты серной Р,* предварительно разведенной примерно 250 мл *воды Р,* доводят *водой Р до* объёма 500 мл.

Хранят в защищённом от света месте.

Динатрия арсенат. $Na_2HAsO_4,7H_2O$. *(М.м.* 312,0). *1102500.* [10048-95-0]. Динатрия гидроарсенат гептагидрат.

Кристаллы, выветривающиеся на воздухе. Легко растворим в воде, растворим в глицерине, мало растворим в 96% спирте. Водный раствор имеет щелочную реакцию по лакмусу.

d_{20}^{20}: около 1,87.

Температура плавления: около 57°C (при быстром нагревании).

Динатрия бицинхонинат. $C_{20}H_{10}N_2Na_2O_4$. *(М.м.* 388,3). *1126600.* [979-88-4]. Динатрий 2,2’-биквинолин-4-4’-дикарбоксилат.

Динатрия гидрофосфат. $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$. *(М.м.* 358,1). *1033300.* [10039-32-4].

Динатрия фосфат додекагидрат.

Содержит не менее 98,0% и не более 101,0% Na_2HPO_4·в пересчете на безводное вещество.

Кристаллы бесцветные, прозрачные. Легко выветриваются. Очень легко растворим в воде, практически нерастворим в 96% спирте.

Хранят в плотно укупоренном контейнере.

Динатрия гидрофосфата раствор. *1033301.*

Раствор 90 г/л.

Динатрия гидрофосфат безводный. Na_2HPO_4. *(М.м.* 142,0). *1033400.* [7558-79-4].

Динатрия гидрофосфат дигидрат. $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$. *(М.м.* 178,0). *1033500.*

[10028-24-7].

Содержит не менее 98,0% и не более 101,0% Na_2HPO_4·в пересчете на сухое вещество.

Порошок белого или почти белого цвета или бесцветные кристаллы. Растворим в воде, практически нерастворим в 96% спирте.

Хранят в плотно укупоренном контейнере.

Динатрия гидроцитрат. $C_6H_6Na_2O_7 \cdot 1,5H_2O$. *(М.м.* 263,1). *1033200.* [144-33-2]. Натрия цитрат кислый. Динатрия 2-гидроксипропан-1,2,3-трикарбоксилат кислый сесквигидрат.

Порошок белого цвета. Растворим менее чем в 2 частях воды, практически нерастворим в 96% спирте.

Динатрия тетраборат. $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$. *(М.м.* 381,4). *1033600.* [1330-43-4]. Динатрия тетработата декагидрат. Натрия тетраборат. Бура.

Кристаллический порошок белого цвета или бесцветные кристаллы, или кристаллическая масса. Выветривается на воздухе. Растворим в воде, очень легко растворим в кипящей воде, легко растворим в глицерине.

Содержит не менее 99,0% и не более 103,0% $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$.

Хранят в плотно укупоренном контейнере.

Динитробензоилхлорид. $C_7H_3ClN_2O_5$. *(М.м.* 230,6). *1031400.* [99-33-2].

3,5-Динитробензоилхлорид.

Кристаллический порошок светло-жёлтого цвета или бесцветные кристаллы.

Температура плавления: около 68°С.

Динитробензойная кислота. $C_7H_4N_2O_6$. *(М.м.* 212,1). *1031300.* [99-34-3].

3,5-Динитробензойная кислота.

Кристаллы почти бесцветные. Мало растворима в воде, очень легко растворима в 96% спирте.

Температура плавления: около 206°С.

Динитробензойной кислоты раствор. *1031301.* Раствор 20 г/л в *96% спирте Р.*

Динитробензол. $C_6H_4N_2O_4$. *(М.м.* 168,1). *1031200.* [528-29-0]. 1,3-Динитробензол.

Кристаллический порошок или кристаллы желтоватого цвета. Практически нерастворим в воде, мало растворим в 96% спирте.

Температура плавления: около 90°С.

Динитробензола раствор. *1031201.*

Раствор 10 г/л в *96% спирте Р.*

Динитрофенилгидразин. $C_6H_6N_4O_4$. *(М.м.* 198,1). *1031500.* [119-26-6].

2,4-Динитрофенилгидразин.

Кристаллы красновато-оранжевого цвета. Очень мало растворим в воде, мало растворим в 96% спирте.

Температура плавления: около 203°С (метод мгновенного плавления).

Динитрофенилгидразина спиртовой раствор. 0,5 г *2,4-динитрофенилгидразина Р* помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 6 мл *кислоты хлористоводородной Р* и перемешивают до исчезновения красно-оранжевого окрашивания осадка. Прибавляют 20 мл *этанола Р*, нагревают смесь на водяной бане до получения прозрачного раствора, охлаждают и доводят тем же *этанолом* Р до метки.

Полученный раствор хранят в холодном месте. Срок годности 3 мес.

Динитрофенилгидразина уксусно-хлористоводородный раствор. *1031501.*

0,2 г *динитрофенилгидразина Р* растворяют в 20 мл *метанола Р,* прибавляют 80 мл смеси равных объемов *кислоты уксусной Р* и *кислоты хлористоводородной Р1* и перемешивают. Готовят непосредственно перед использованием.

Динитрофенилгидразина хлористоводородный раствор. *1031502.*

0,50 г динитрофенилгидразина Р растворяют при нагревании в кислоте в хлористоводородной разведённой Р, доводят объём раствора тем же растворителем до 100 мл, охлаждают и фильтруют. Готовят непосредственно перед использованием.

Динонилфталат. $C_{26}H_{42}O_4$. *(М.м.* 418,6). *1031600.* [28553-12-0].

Бесцветная или светло-жёлтого цвета вязкая жидкость.

d_{20}^{20}:от 0,97 до 0,98.

n_D^{20}: от 1,482 до 1,489.

Кислотность. 5,0 г встряхивают с 25 мл *воды Р* в течение 1 мин. После разделения слоев отделяют водный слой, прибавляют 0,1 *мл раствора фенолфталеина Р;* окраска раствора должна измениться при прибавлении не более 0,3 мл *0,1 М раствора натрия гидроксида* (0,05% в пересчёте на кислоту фталевую).

Вода (2.5.12). Не более *0,1%.*

Диоксан. $C_4H_8O_2$. *(М.м.* 88,1). *1032000.* [123-91-1]. 1,4-Диоксан.

Прозрачная, бесцветная жидкость. Смешивается с водой и большинством органических растворителей.

d_{20}^{20}: около 1,03.

Температура затвердевания (2.2.18). От 9°С до 11°С.

Вода (2.5.12). Не более *0,5%.*

Не перегоняют, если диоксан не выдерживает испытания на пероксиды.

Пероксиды. 8 мл *раствора крахмала с калия йодидом Р* помещают в цилиндр с притёртой стеклянной пробкой вместимостью 12 мл и диаметром около 1,5 см, заполняют полностью диоксаном и перемешивают. Выдерживают в тёмном месте в течение 30 мин. Не должно обнаруживаться окрашивания.

Диоксан, используемый для жидкостной сцинтилляции, должен быть соответствующей степени чистоты.

Диоксана исходный раствор. *1032001.*

1,00 г *диоксана Р* растворяют в *воде Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл. 5,0 мл полученного раствора доводят *водой Р* до объёма 50,0 мл (1,0 мг/мл).

Диоксана раствор. *1032002.*

50,0 мл *исходного раствора диоксана Р* доводят *водой Р* до объёма 100,0 мл (0,5 мг/мл диоксана).

Диоксана раствор Р1.*1032003.*

10,0 мл *раствора диоксана Р* доводят *водой Р* до объёма 50,0 мл (0,1 мг/мл диоксана).

м-Диоксибензол. См. *Резорцин.*

Ди(октадецил)-3,3'-тиодипропионат. $C_{42}H_{82}O_4S$. *(М.м.* 683). *1031900.* [693-36-7].

Кристаллический порошок белого цвета. Практически нерастворим в воде, легко растворим в метиленхлориде, умеренно растворим в ацетоне, 96% спирте и петролейном эфире.

Температура плавления: от 58°С до 67°С.

2,2'-Ди(октадецилокси)-5,5'-спироби(1,3,2-диоксафосфоринан). $C_{41}H_{82}O_6P_2$.

(М.м. 733). *1031800.*

Твердое воскообразное вещество белого цвета. Практически нерастворим в воде, растворим в растворах гидрокарбонатов.

Температура плавления: от 40°С до 70°С.

Диоктадецилдисульфид. $C_{36}H_{74}S_2$. *(М.м.* 571,1). *1031700.* [1844-09-3].

Порошок белого цвета. Практически нерастворим в воде.

Температура плавления: от 53°С до 58°С.

Дитизон. $C_{13}H_{12}N_4S$. *(М.м.* 256,3). *1033900.* [60-10-6]. 1,5-Дифенилтиокарбазон.

Порошок синевато-чёрного, или коричневато-чёрного, или чёрного цвета. Практически нерастворим в воде, растворим в 96% спирте.

Хранят в защищённом от света месте.

Дитизона раствор. *1033901.* Раствор 0.5 г/л в *хлороформе Р.*

Готовят непосредственно перед использованием.

Дитизона раствор Р2. *1033903.*

40,0 мг *дитизона Р* растворяют *в хлороформе Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 1000,0 мл. 30,0 мл полученного раствора доводят *хлороформом Р* до объёма 100,0 мл.

Установка титра. Количество *ртути (II) хлорида Р,* эквивалентное 0,1354 г $HgCl_2$, растворяют в смеси равных объёмов *кислоты серной разведенной Р* и *воды Р* и

доводят объём раствора той же смесью растворителей до 100,0 мл. 2,0 мл полученного раствора доводят смесью равных объемов *кислоты серной разведенной Р и воды Р до* объёма 100,0 мл (раствор содержит 20 ppm Hg). 1,0 мл полученного раствора помещают в длительную воронку, прибавляют 50 мл *кислоты серной разведённой Р*, 140 мл *воды Р* и 10 мл раствора 200 г/л *гидроксиламина гидрохлорида Р*. Титруют приготовленным раствором дитизона; после каждого прибавления титранта смесь встряхивают 20 раз, к концу титрования смесь оставляют для разделения слоёв, затем отбрасывают хлороформный слой и продолжают титровать до синевато-зелённого окрашивания.

Количество ртути (Э) в миллиграммах, эквивалентное содержанию дитизона в одном миллилитре раствора, вычисляют по формуле: *Э* = 20/V, где V- объем раствора дитизона, израсходованный на титрование, в миллилитрах.

Дитизон Р1. $C_{13}H_{12}N_4S$. *(М.м.* 256,3). *1105500.* [60-10-6]. 1,5-Дифенилтиокарбазон.

Содержит не менее 98,0% $C_{13}H_{12}N_4S$.

Порошок синевато-чёрного, или коричневато-чёрного, или чёрного цвета. Практически нерастворим в воде, растворим в 96% спирте.

Хранят в защищённом от света месте.

5,5'-Дитиобис(2-нитробензойная кислота). $C_{l4}H_8N_20_8S_2$. *(М.м.* 396,4). *1097300.*

[69-78-3]. 3-Карбокси-4-нитрофенилдисульфид. Реактив Эльмана. DTNB.

Порошок жёлтого цвета. Умеренно растворима в 96% спирте.

Температура плавления: около 242°С.

Дитиол. $C_7H_8S_2$. *(М.м.* 156,3). *1033800.* [496-74-2]. Толуол-3,4-дитиол.

4-Метилбензол-1,2-дитиол.

Кристаллы белого цвета, гигроскопичны. Растворим в метаноле и растворах гидроксидов щелочных металлов.

Температура плавления: около 30°С. Хранят в воздухонепроницаемом контейнере.

Дитиола реактив. *1033801.*

К 1 г *дитиола Р* прибавляют 2 мл *кислоты тиогликолевой Р* и доводят раствором 20 г/л *натрия гидроксида Р* до объёма 250 мл.

Готовят непосредственно перед использованием.

Дитиотреитол. $C_4H_{10}O_2S_2$. *(М.м.* 154,2). *1098200.* [27565-41-9]. *трео*-1,4-Димеркаптобутан-2,3-диол.

Игольчатые, слабо гигроскопичные кристаллы. Легко растворим в воде, ацетоне и этаноле.

Хранят в воздухонепроницаемом контейнере.

Дифениламин. $C_{12}H_{11}N$. *(М.м.* 169,2). *1032100.* [122-39-4].

Кристаллы белого цвета. Мало растворим в воде, растворим в 96% спирте.

Температура плавления: около 55°С.

Хранят в защищённом от света месте.

Дифениламина раствор. *1032101.* Раствор 1 г/л в *кислоте серной Р.*

Хранят в защищённом от света месте.

Дифениламина раствор Р1. *1032102.*

Раствор 10 г/л в *кислоте серной Р.* Раствор должен быть бесцветным.

Дифениламина раствор Р2. *1032103.*

1 г *дифениламина Р* растворяют в 100 мл *кислоты уксусной ледяной Р и* прибавляют 2,75 мл *кислоты серной Р.*

Раствор используют немедленно.

Дифенилантрацен. $C_{26}H_{18}$. *(М.м.* 330,4). *1032200. [*1499-10-1].

9,10-Дифенилантрацен.

Кристаллический порошок от желтоватого до жёлтого цвета. Практически нерастворим в воде, легко растворим в эфире.

Температура плавления: около 248°С.

Дифенилбензидин. $C_{24}H_{20}N_2$. *(М.м.* 336,4). *1032300.* [531-91-9].

N,N-Дифенилбензидин. N,N-Дифенилбифенил-4,4'-диамин.

Кристаллический порошок белого или белого с сероватым оттенком цвета. Практически нерастворим в воде, мало растворим в ацетоне и 96% спирте.

Температура плавления: около 248°С.

Нитраты. 8 мг растворяют в охлаждённой смеси 5 мл *воды Р* и 45 мл *кислоты серной, свободной от азота, Р;* полученный раствор должен быть бесцветным или слегка голубоватого цвета.

Сульфатная зола (2.4.14). Не более 0,1%.

Хранят в защищённом от света месте.

Дифенилборной кислоты аминоэтиловый эфир. $C_{14}H_{16}BNO$. *(М.м.* 225.1). *1032400.* [524-95-8].

Кристаллический порошок белого или слегка желтоватого цвета. Практически нерастворим в воде, растворим в 96% спирте.

Температура плавления: около 193°С.

N,N'-Дифенилгуанидин. $C_{13}H_{13}N_3$. *(М.м.* 211,3).

Мелкокристаллический порошок белого или светло-желтого цвета.

Дифенилкарбазид. $C_{13}H_{14}N_4O$. *(М.м.* 242,3). *1032500.* [140-22-7].

1,5-Дифенилкарбондигидразид.

Кристаллический порошок белого цвета, постепенно розовеет на воздухе. Очень мало растворим в воде, растворим в ацетоне, 96% спирте и кислоте уксусной ледяной.

Температура плавления: около 170°С.

Сульфатная зола (2.4.14). Не более 0,1%.

Хранят в защищённом от света месте.

Дифенилкарбазида раствор. *1032501.*

0,2 г *дифенилкарбазида Р* растворяют в 10 мл *кислоты уксусной ледяной Р* и доводят объём раствора *этанолом Р до* 100 мл.

Готовят непосредственно перед использованием.

Дифенилкарбазон. $C_{13}H_{12}N_4O$. *(М.м.* 240,3). *1032600.* [538-62-5].

1,5-Дифенилкарбазон.

Кристаллический порошок оранжево-жёлтого цвета. Практически нерастворим в воде, очень легко растворим в 96% спирте.

Температура плавления: около 157°C с разложением.

Дифенилкарбазон-ртутный реактив. *1032601.*

Раствор I. 0,1 г *дифенилкарбазона Р* растворяют в *этаноле Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 50 мл.

Раствор II. 1 г *ртут и(II) хлорида Р* растворяют в *этаноле Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 50 мл.

Смешивают равные объемы растворов I и II.

Дифенилоксазол. $C_{15}H_{11}NO$. *(М.м.* 221,3). *1032700.* [92-71-7]. 2,5-Дифенилоксазол.

Порошок белого цвета. Практически нерастворим в воде, растворим в метаноле, умеренно растворим в диоксане и кислоте уксусной ледяной.

Температура плавления: около 70°C.

$A_{1см}^{1\%}$: около 1260. Определение проводят при длине волны 305 нм, используя в качестве растворителя *метанол Р.*

Дифенилоксазол, используемый для жидкостной сцинтилляции, должен быть соответствующей степени чистоты.

Дифенилфениленоксида полимер. *1032800.* Полимер 2,6-дифенил-n-фениленоксида.

Пористые гранулы шарообразной формы, белого или почти белого цвета; размер гранул указывают в испытаниях, в которых они используются.

Дихлорбензол. $C_6H_4Cl_2$. *(М.м.* 147,0). *1027100.* [95-50-1]. 1,2-Дихлорбензол.

Бесцветная маслянистая жидкость. Практически нерастворим в воде, растворим в этаноле и эфире.

d_{20}^{20}: около 1,31.

Температура кипения: около 180°C.

Дихлорметан. См. *Метиленхлорид.*

Дихлорофос. $C_4H_7Cl_2O_4P$. *(М.м.221). 1101200.* [62-73-7].

2,2-Дихлорвинилдиметилфосфат.

Жидкость от бесцветного до коричневато-жёлтого цвета. Растворим в воде, смешивается с большинством органических растворителей.

n_D^{25}: около 1,452.

Дихлоруксусная кислота. $C_2H_2Cl_2O_2$. *(М.м.* 128,9). *1027000.* [79-43-6].

Бесцветная жидкость. Смешивается с водой, 96% спиртом и эфиром.

d_{20}^{20}: около 1,566.

n_D^{20}: около 1,466.

Температура кипения: около 193°С.

Дихлоруксусной кислоты раствор. *1027001.*

67 мл *кислоты дихлоруксусной Р* доводят *водой Р* до объёма 300 мл и нейтрализуют *раствором аммиака Р* по *синей лакмусовой бумаге Р.* Охлаждают, прибавляют 33 мл *кислоты дихлоруксусной Р* и доводят *водой Р* до объёма 600 мл.

Дихлорфенолиндофенола натриевая соль. $C_{12}H_6Cl_2NNaO_2,2H_2O$. *(М.м.* 326,1). *1027300.* [620-45-1].

Натрия 2,6-дихлор-N-(4-гидроксифенил)-1,4-бензохинонмоноимин дигидрат.

2,6-Дихлорфенолиндофенолят натрия.
Порошок тёмно-зелёною цвета. Легко растворима в воде и этаноле. Водный раствор имеет тёмно-синюю окраску, которая при подкислении раствора переходит в розовую.

Дихлорфенолиндофенола титрованный раствор. *1027301.*

50,0 мг *дихлорфенолиндофенола натриевой соли* Р растворяют в 100,0 мл *воды Р и* фильтруют.

Установка титра. 20,0 мг *кислоты аскорбиновой Р* растворяют в 10 мл свежеприготовленного раствора 200 г/л *кислоты метафосфорной Р* и доводят объём раствора *водой Р* до 250,0 мл. 5,0 мл полученного раствора быстро титруют приготовленным раствором дихлорфенолиндолфенола из микробюретки с ценой деления 0,01 мл до розового окрашивания, не исчезающего в течение 10 с, время титрования должно быть не более 2 мин. Раствор дихлорфенолиндолфенола разводят *водой Р* до получения раствора, 1 мл которого соответствует 0,1 мг кислоты аскорбиновой ($C_6H_80_6$).

Срок годности 3 сут. Титр устанавливают непосредственно перед использованием.

Дихлорфлуоресцеин. $C_{20}H_{10}Cl_2O_5$. *(М.м.* 401,2). *1027200.* [76-54-0].

2,7-Дихлорфлуоресцеин.

2-(2,7-Дихлор-6-гидрокси-3-оксо-3Н-ксантен-9-ил)бензойная кислота.

Порошок от желтовато-коричневого до жёлто-оранжевого цвета. Мало растворим в воде, легко растворим в 96% спирте и разведенных растворах гидроксидов щелочных металлов с образованием раствора с желтовато-зелёной флуоресценцией, практически не растворим в эфире.

Дихлорхинонхлоримид. $C_6H_2Cl_3NO$. *(М.м.* 210,4). 27400. [101-38-2].

2,6-Дихлор-N-хлор-1,4-бензхинонмоноимин.

Кристаллический порошок от светло-жёлтого до зеленовато-жёлтого цвета. Практически нерастворим в воде, растворим в 96% спирте и разведенных растворах гидроксидов щелочных металлов.

Температура плавления: около 66°С.

1,2-Дихлорэтан. $C_2H_4Cl_2$. *(М.м.*98,96). Этиленхлорид. Этилен хлористый.

Прозрачная бесцветная жидкость, несмешивающаяся с водой.

Дициклогексил. $C_{l2}H_{22}$. *(М.м.*166,3). *1135300.* [92-51-3]. Бициклогексил.

d_{20}^{20}: около 0,896.

Температура кипения: около 227°С.

Температура плавления: около 4°C.

Дициклогексиламин. $C_{12}H_{23}N$. *(М.м.*181,3). *1027500.* [101-83-7].

N,N-Дициклогексиламин.

Бесцветная жидкость. Умеренно растворим в воде, смешивается с обычными органическими растворителями.

n_D^{20}: около 1,484.

Температура кипения: около 256°C.

Температура затвердевания (2.2.18). От 0°C до 1°C.

Дициклогексилмочевина. $C_{13}H_{24}N_2O$. *(М.м.*224.4). *1027600.* [2387-23-7].

1,3-Дициклогексилмочевина.

Кристаллический порошок белого цвета. Температура плавления: около 232°C.

Диэтаноламин. $C_4H_{11}NO_2$. *(М.м.* 105,1). *1027800.* [111-42-2]. 2,2'-Иминобисэтанол.

Прозрачная, вязкая жидкость слегка желтоватого цвета или кристаллы, расплывающиеся на воздухе, плавятся при температуре около 28°C. Очень легко растворим в воде, в ацетоне и метаноле.

d_{20}^{20}: около 1,09.

pH (2.2.3). От 10,0 до 11,5. Измеряют pH раствора 50 г/л.

Диэтаноламин, используемый в испытании на щелочную фосфатазу, должен выдерживать следующее дополнительное испытание.

Этаноламин. Не более 1,0%. Определение проводят методом газовой хроматографии *(2.2.28),* используя в качестве внутреннего стандарта *пропаноламин Р.*

Раствор внутреннего стандарта. 1,00 г *пропаноламина Р* растворяют в *ацетоне Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 10,0 мл.

Испытуемый раствор (а). 5,00 г диэтиламина растворяют в *ацетоне Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 10,0 мл.

Испытуемый раствор (b). 5,00 г диэтиламина растворяют в *ацетоне Р,* прибавляют 1,0 мл раствора внутреннего стандарта и доводят объём раствора тем же растворителем до 10,0 мл.

Растворы сравнения. 0,50 г *этаноламина Р* растворяют в *ацетоне Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 10,0 мл. К 0,5 мл, 1,0 мл и 2,0 мл полученного раствора прибавляют по 1,0 мл раствора внутреннего стандарта и доводят объём каждого раствора *ацетоном Р* до 10,0 мл.

Хроматографирование проводят на газовом хроматографе с пламенно-ионизационным детектором.

Хроматографируют по 1,0 мкл каждого испытуемого раствора и по 1,0 мкл каждого раствора сравнения в следующих условиях:

— колонка размером 1 м x 4 мм, заполненная *полимером дифенилфениленоксида Р* с размером частиц от 180 мкм до 250 мкм;
— газ-носитель *азот для хроматографии Р;*
— скорость газа-носителя 40 мл/мин;
— температуру колонки поддерживают при 125°C в течение 3 мин; а затем повышают температуру до 300°C со скоростью 12°C/мин;
— температура блока в вода проб 250°C;
— температура детектора 280°C.

Хранят в воздухонепроницаемом контейнере.

Диэтиламин. $C_4H_{11}N$. *(М.м.*73,1*). 1028000.* [109-89-7].

Прозрачная, бесцветная, воспламеняющаяся жидкость. Имеет сильнощелочную реакцию, смешивается с водой и 96% спиртом.

d_{20}^{20}: около 0,71.

Температура кипения: около 55°C.

Диэтиламиноэтилдекстран. *1028200.*

Анионообменная смола в форме гидрохлорида. Порошок, образующий с водой гель.

N,N-Диэтиланилин. $C_{10}H_{15}N$. (*М.м.*149,2). *1028400.* [91-66-7].

d_{20}^{20}: около 0,938.

Температура кипения: около 217°C.

Температура плавления: около -38°C.

Ди(2-этилгексил)фталат. $C_{24}H_{38}O_4$. *(М.м.* 390,5). *1028100.*

Ди(2-этилгексил)бензол-1,2-дикарбоксилат.

Прозрачная, маслянистая жидкость. Практически нерастворим в воде, растворим в органических растворителях.

d_{20}^{20}*:* около 0,98.

n_D^{20}: около 1,486.

Вязкость (2.2.9). Около 80 мПа-с.

Диэтиленгликоль. $C_4H_{10}O_3$. *(М.м.* 106,1). *1028300.* [111-46-6]. 2,2'-Оксидиэтанол.

Содержит не менее 99,5*% (м/м)* $C_4H_{10}O_3$

Прозрачная, бесцветная, гигроскопичная жидкость. Смешивается с водой, ацетоном и 96% спиртом.

d_{20}^{20}: около 1,118.

n_D^{20}: около 1,447.

Температура кипения: от 244°C до 246°C.

Хранят в воздухонепроницаемом контейнере.

Диэтилфенилендиамина сульфат. $C_{10}H_{18}N_2O_4S$. *(М.м.* 262,3). *1028600.* [6283-63-2]. *N,N'*-Диэтил-п-фенилендиамина сульфат. N,N-Диэтилбензол-1,4-диамина сульфат.

Порошок белого или слегка желтоватого цвета. Растворим в воде.

Температура плавления: около 185°C с разложением.

Хранят в защищённом от света месте.

Диэтилфенилендиамина сульфата раствор. *1028601.*

К 250 мл *воды Р* прибавляют 2 мл *кислоты серной* Р и 25 мл *0,02 М раствора натрия эдетата.* В полученном растворе растворяют 1,1 г *диэтилфенилендиамина сульфата Р* и доводят *водой* Р до объёма 1000 мл.

Используют только бесцветный раствор.

Хранят в прохладном, защищённом от света месте.

Срок годности 1 мес.

***N,N*-Диэтилэтан-1,2-диамин.** *1028500.* [100-36-7]. См. *N,N- диэтилэтилендиамин*

N,N-Диэтилэтилендиамин. $C_6H_{16}N_2$. *(М.м.* 116,2). *1028500.* [100-36-7].

Содержит не менее 98% $C_6H_{16}N_2$.

Слегка маслянистая жидкость, бесцветная или слегка желтоватого цвета, с сильным запахом аммиака. Оказывает раздражающее действие на кожу, глаза и слизистые оболочки.

d_{20}^{20}: 0,827.

Температура кипения: от 145°C до 147°C.

Вода (2.5.12). Не более 1,0%. Определение проводят из 0,500 г.

Диэтокситетрагидрофуран. $C_8H_{16}O_3$. *(М.м.* 160,2). *1027900.* [3320-90-9].

2,5-Диэтокситетрагидрофуран. Смесь *цис* и *транс* изомеров.

Прозрачная, бесцветная или слегка желтоватого цвета жидкость. Практически не растворим в воде, растворим в 96% спирте, эфире и большинстве других органических растворителей.

d_{20}^{20}: около 0,98.

n_D^{20}: около 1,418.

Докузат натрия. $C_{20}H_{37}NaO_7S$. *(М.м.* 444,6). *1034100.* [577-11-7].

Натрий 1,4-бис[(2-этилгексил)окси]-1,4-диокобутан-2-сульфонат.

Белая или почти белая воскообразная масса или хлопья. Гигроскопичен. Умеренно растворим в воде, легко растворим в 96% спирте и метиленхлориде.

Содержит не менее 98,0% и не более 101,0% $C_{20}H_{37}NaO_7S$ в пересчете на безводное вещество.

Дотриаконтан. $C_{32}H_{66}$. *(М.м.* 450,9). *1034200.* [544-85-4]. н-Дотриаконтан.

Пластинки белого цвета. Практически нерастворим в воде, умеренно растворим в гексане, мало растворим в эфире.

Температура плавления: около 69°C.

Примеси. Не более 0,1% примесей со временем удерживания, характерным для α-токоферола ацетата; определение проводят методом газовой хроматографии, как указано в статье *α-Токоферола ацетат.*

Драгендорфа реактив.

Раствор I. К 0,85 г *висмута нитрата основного Р* прибавляют 40 мл *воды Р*, 10 мл кислоты *уксусной ледяной Р* и взбалтывают в течение 15 мин.

Раствор II. 8 г *калия йодида Р* растворяют в 20 мл *воды Р*.

Смешивают равные объемы растворов I и II. К 10 мл полученной смеси прибавляют 100 мл *воды Р* и 20 мл *кислоты уксусной ледяной Р*.

Драгендорфа реактив модифицированный.

Раствор I. К 0,85 г *висмута нитрата основного Р* прибавляют 40 мл *воды Р*, 10 мл кислоты *уксусной ледяной Р* и взбалтывают в течение 15 мин.

Раствор I. К 0,85 г *висмута нитрата основного Р* прибавляют 40 мл *воды Р*, 10 мл кислоты *уксусной ледяной Р* и взбалтывают в течение 15 мин.

Растворы I и II смешивают (основной раствор).

Непосредственно перед применение 5 мл основного раствора смешивают с 5 мл раствора 10 г/л *кислоты аскорбиновой Р* и 5 мл *96% спирта Р*.

Дубильная кислота. См. *Таниновая кислота.*

Желатин. *1040000.* [9000-70-8].

Желатин – очищенный белок, полученный путем частичного кислотного гидролиза (тип А) или частичного щелочного гидролиза (тип В) животного коллагена. Может быть в виде смеси двух типов.

Полупрозрачные пластины, гранулы или порошок от слабо желтоватого до слегка желтовато-коричневого цвета. Практически нерастворим в обычных органических растворителях. Набухает в холодной воде и при нагревании образует коллоидный раствор, который при охлаждении переходит в гель.

Изоэлектрическая точка желатина типа А находится в пределах рН 6,3-9,2, а для желатина типа В – рН 4,7-5,2.

Желатин гидролизованный. *1040100.*

50 г *желатина Р* растворяют в 1000 мл *воды Р.* Обрабатывают насыщенным паром в автоклаве при температуре 121°С в течение 90 мин и лиофилизируют.

Железа (III) аммония сульфат. $FeNH_4(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$. *(М.м.* 482,2). *1037700.*

[7783-83-7]. Железа аммония дисульфат додекагидрат.

Кристаллы бледно-фиолетового цвета, выцветающие на воздухе. Очень легко растворим в воде, практически нерастворим в 96% спирте.

Железа (III) аммония сульфата раствор Р2. *1037702.*

Раствор 100 г/л.

Перед использованием фильтруют, если необходимо.

Железа (III) аммония сульфата раствор Р5. *1037704.*

Встряхивают 30,0 г *железа (III) аммония сульфата Р* с 40 мл *кислоты азотной Р* и доводят объём раствора *водой Р* до 100 мл. Если раствор мутный, его центрифугируют или фильтруют.

Хранят в защищённом от света месте.

Железа (III) аммония сульфата раствор Р6. *1037705.*

20 г *железа (III) аммония сульфата Р* растворяют в 75 мл *воды Р,* прибавляют 10 мл раствора 2,8% *(об/об) кислоты серной Р* и доводят объём раствора *водой Р* до 100 мл.

Железа (III) нитрат. $Fe(NO_3)_3,9H_2O$. *(М.м.* 404). *1106100.* [7782-61-8].

Содержит не менее 99,0% *(м/м)* $Fe(N0_3)_3 \cdot 9H_2O$.

Кристаллы или кристаллическая масса светло-розового цвета. Очень легко растворим в воде.

Свободная кислота: не более 0,3% (в виде HNO_3).

Железа (III) сульфат. $Fe_2(SO_4)_3 \cdot xH_2O$. *1037900.* [10028-22-5]. Железа (III) трисульфат водный.

Порошок желтовато-белого цвета, сильно гигроскопичен, разлагается на воздухе. Мало растворим в воде и 96% спирте.

Хранят в воздухонепроницаемом контейнере, в защищённом от света месте.

Железа (III) хлорид. $FeCl_3 \cdot 6H_2O$. *(М.м.* 270,3). *1037800.* [10025-77-1]. Железа трихлорид гексагидрат.

Кристаллическая масса жёлто-оранжевого или коричневого цвета, расплывающаяся на воздухе. Очень легко растворим в воде, растворим в 96% спирте и эфире. Под действием света железа (III) хлорид и его растворы частично восстанавливаются.

Хранят в воздухонепроницаемом контейнере.

Железа (III) хлорида раствор Р1. *1037801.* Раствор 105 г/л.

Железа (III) хлорида раствор Р2.*1037802.* Раствор 13 г/л.

Железа (III) хлорида раствор Р3. *1037803.*

2,0 г *железа (III) хлорида Р* растворяют в *этаноле Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл.

Железа (III) хлорида и сульфаминовой кислоты реактив. *1037804.*

Раствор содержит 10 г/л *железа (III) хлорида Р* и 16 г/л *кислоты сульфаминовой Р.*

Железа (II) аммония сульфат. $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$. *(М.м.* 392,2). *1038200.* [7783-85-9]. Железа диаммония дисульфат гексагидрат.

Кристаллы бледного голубовато-зеленоватого цвета или гранулы. Легко растворим в воде, практически нерастворим в 96% спирте.

Хранят в защищённом от света месте.

Железа (II) сульфат. $FeSO_4 \cdot 7H_2O$. *(М.м.* 278,0). *1038300.* [7782-63-0]. Железа сульфат гептагидрат.

Содержит не менее 98,0% и не более 105,0% $FeSO_4 \cdot 7H_2O$.

Кристаллический порошок светло-зеленого цвета или голубовато-зеленые кристаллы. Выветривается на воздухе. Легко растворим в воде, очень легко растворим в кипящей воде, практически нерастворим в 96% спирте. Железа сульфат окисляется на открытом воздухе, окрашиваясь в коричневый цвет.

Хранят в воздухонепроницаемом контейнере.

Железа (II) сульфата раствор Р2. *J038301.*

0,45 г *желез (II) сульфата Р* растворяют в 50 мл *0,1 М раствора кислоты хлористоводородной* и доводят объём раствора *водой, свободной от углерода диоксида,* Р до 100 мл.

Готовят непосредственно перед использованием.

Железа салицилата раствор. *1046700.*

0,1 г *желез а(III) аммония сульфата Р* растворяют в смеси 2 мл *кислоты серной разведенной Р* и 48 мл *воды Р,* доводят объём раствора *водой* Р до 100 мл. К полученному раствору прибавляют 50 мл раствора 11,5 г/л *натрия салицилата Р,* 10 мл *кислоты уксусной разведенной Р,* 80 мл раствора 136 г/л *натрия ацетата Р* и доводят объём раствора *водой Р до* 500 мл.

Готовят непосредственно перед использованием.

Хранят в воздухонепроницаемом контейнере, в защищённом от света месте.

Железо. Fe. *(А.м.* 55,85). *1046600.* [7439-89-6].

Порошок серого цвета или проволока. Растворимо в разведенных минеральных кислотах.

Желтая кровяная соль. См. **Калия ферроцианид.**

Желудочный искусственный сок. *1039900.*

2,0 г *натрия хлорида* Р и 3,2 г *пепсина порошка Р* растворяют в *воде Р,* прибавляют 80 мл *1 М раствора кислоты хлористоводородной* и доводят объём раствора *водой* Р до 1000 мл.

Заменитель тромбоцитов. *1066400.*

К 0,5-1 г *фосфолипидов Р* прибавляют 20 мл *ацетона Р* и встряхивают в течение 2 ч, затем центрифугируют в течение 2 мин и сливают надосадочную жидкость. Остаток сушат в вакууме (водяной насос), прибавляют 20 *мл хлороформа Р,* встряхивают в течение 2 ч и фильтруют под вакуумом; полученный остаток суспендируют в 5-10 мл раствора 9 г/л *натрия хлорида Р.*
Для использования в количественном определении фактора IX готовят разведенную суспензию в растворе 9 г/л *натрия хлорида* Р таким образом, чтобы разность времени коагуляции между последовательными разведениями суспензий БСО составляла около 10 с.

Хранят разведенные суспензии при температуре -30°С. Срок годности 6 нед.

Изатин. $C_8H_5NO_2$. *(М.м.* 147,1). *1046800.* [91-56-5]. Индолин-2,3-дион.

Мелкие кристаллы желтовато-красного цвета. Мало растворим в воде, растворим в горячей воде, 96% спирте и эфире, растворим в растворах гидроксидов щелочных металлов с образованием фиолетового окрашивания, переходящего при стоянии в жёлтое.

Температура плавления: около 200°С с частичной сублимацией.

Сульфатная зола (2.4.14). Не более 0,2%.

Изатина реактив. *1046801.*

6 мг *железа (III) сульфата Р* растворяют в 8 мл *воды Р,* прибавляют при перемешивании 50 мл *кислоты серной Р;* к полученному раствору прибавляют 6 мг *изатина Р и* перемешивают до растворения.

Раствор должен быть светло-жёлтого цвета, но не должен иметь оранжевый или красный цвет.

Известь жженая. См. *Кальция оксид.*

Изоамиловый спирт. $C_5H_{12}O$. *(М.м.* 88,1). *1046900.* [123-51-3].

3-Метилбутан-1-ол.

Бесцветная жидкость. Мало растворим в воде, смешивается с 96% спиртом и эфиром.

Температура кипения: около 130°C.

Изоандростерон. $C_{19}H_{30}O_2$. *(М.м.* 290,4). *1107100.* [481-29-8]. Эпиандростерон. 3b -Гидрокси-5a -андростан-17-он.

Порошок белого цвета. Практически нерастворим в воде, растворим в органических растворителях.

Температура плавления: от 172°C до 174°C.

$[a]_D^{20}$: +88°. Определение проводят, используя раствор 20 г/л в *метаноле Р.*

ΔA *(2.2.41):* 14,24·10^3. Определение проводят при длине волны 304 нм, используя раствор 1,25 г/л.

Изобарбитуровая кислота. См. *5-Гидроксиурацил.*

Изоментол. $C_{10}H_{20}O$. *(М.м.* 156,3). *1047000.* [23283-97-8].
*(+)-Изоментол: (lS,2R,5R)-2-изо*пропил-5-метилциклогексанол.

(±)-Изоментол: смесь равных частей *(1S,2R,5R)*-и (1R,2S,5S)-2-изопропил-5-метилциклогексанола.

Бесцветные кристаллы. Практически не растворим в воде, очень легко растворим в 96% спирте и эфире.

$[a]_D^{20}$: (+)-*Изоментол:* около +24°. Определение проводят, используя раствор 100 г/л в *96% спирте Р.*

Температура кипения *(+)-Изоментола:* около 218°C.

Температура кипения *(±)-Изоментола:* около 218°C.

Температура плавления *(+)-Изоментола:* около 80°C.

Температура плавления *(±)-Изоментола:* около 53°C.

(+)-Изоментон. $C_{10}H_{18}O$. *(М.м.* 154,2). *1047100.*

(1R)-цис-n-Ментан-3-он. (1R)-цис-2-Изопропил-5-метилциклогексанон.

Содержит различные количества ментона.

Бесцветная жидкость. Очень мало растворим в воде, растворим в 96% спирте и эфире.

d_{20}^{20}: около 0,904.

n_D^{20} : около 1,453.

$[a]_D^{20}$: около +93,2°.

Изоментон, используемый в газовой хроматографии, должен выдерживать следующее дополнительное испытание.

Количественное определение. Проводят методом газовой хроматографии *(2.2.28)* в условиях, указанных в статье *Масло мяты перечной,* с использованием (+)-изоментона в качестве испытуемого раствора.

Площадь основного пика должна быть не менее 80,0% суммы площадей всех пиков.

Изопентан. См. *2-Метилбутан.*

Изопропиламин. C_3H_9N. *(М.м.* 59,1). *1119800.* [75-31-0]. Пропан-2-амин.

Бесцветная, сильно летучая, воспламеняющаяся жидкость.

n_D^{20} : около 1,374.

Температура кипения: от 32°C до 34°C.

Изопропилмиристат. $C_{17}H_{34}O_2$. (*М.м.* 270,5). *1047200.* [110-27-0]. 1-метилэтил тетрадеканоат с различным числом изопропиловых эфиров других жирных кислот.

Прозрачная бесцветная, маслянистая жидкость. Не смешивается с водой, смешивается с 96% спиртом, эфиром, метиленхлоридом, жирными маслами и жидким парафином.

4-Изопропилфенол. $C_9H_{12}O$.(*М.м.* 136,2). *1047300.* [99-89-8].

Содержит не менее 98% $C_9H_{12}O$.

Температура кипения: около 212°С.

Температура плавления: от 59°С до 61°С.

Имидазол. $C_3H_4N_2$. *(М.м.* 68,1). *1045400.* [288-32-4].

Кристаллический порошок белого цвета; растворим в воде и 96% спирте.

Температура плавления: около 90°С.

Иминодибензил. $C_{14}H_{13}N$. *(М.м.* 195,3). *1045500.* [494-19-9].

10,11-Дигидродибенз[b,f]азепин.

Кристаллический порошок бледно-жёлтого цвета. Практически нерастворим в воде, легко растворим в ацетоне.

Температура плавления: около 106°С.

Индигокармин. $C_{16}H_8N_2Na_2O_8S_2$. *(М.м.* 466,3). *1045600.* [860-22-0]. Показатель Шульца №1309. Индекс цветности №73015. Динатрия 3,3'-диоксо-2,2'-бисиндолиден-5,5'-дисульфонат. Е 132.

Обычно содержит натрия хлорид.

Порошок от синего до фиолетово-синего цвета или гранулы синего цвета с медным блеском. Умеренно растворим в воде, практически нерастворим в 96% спирте. Осаждается из водного раствора натрия хлоридом.

Индигокармина раствор. ***1045601.***

0,2 г *индигокармина Р* растворяют в смеси 10 *мл кислоты хлористоводородной Р и 990* мл раствора 200 г/л *кислоты серной, свободной от азота, Р.*

Раствор должен выдерживать следующее испытание:

10 мл полученного раствора прибавляют к раствору 1,0 мг *калия нитрата Р в* 10 мл *воды Р,* тотчас прибавляют 20 мл *кислоты серной, свободной от азота, Р* и нагревают до кипения. Синее окрашивание раствора должно исчезнуть в течение 1 мин.

Индигокармина раствор Р1.*1045602.*
4 г *индигокармина Р* растворяют в *воде Р,* прибавляя воду отдельными порциями до объема 900 мл, затем прибавляют 2 мл *кислоты серной Р* и доводят объём раствора *водой Р до* 1000мл.

Установка титра. 10,0 мл *эталонного раствора нитрата (100 ppm NO_3) Р* помещают в коническую колбу с широким горлом вместимостью 100 мл, прибавляют 10 мл *воды Р,* 0,05 мл *раствора индигокармина Р1* и тотчас прибавляют (за один раз, но осторожно) 30 мл *кислоты серной Р.* Полученный раствор немедленно титруют пригототовленным *раствором индигокармина Р1* до стабильной синей окраски.

Количество миллилитров *(n),* израсходованное на титрование, соответствует 1 мг NO_3.

Индометацин. $C_{19}H_{16}ClNO_4$. *(М.м.* 357,8). *1101500.* [53-86-1].

[1-(4-[хлоробензоил)-5-метокси-2-метилиндол-3-ил]уксусная кислота.

Содержит не менее 98,5% и не более 100,5% $C_{19}H_{16}ClNO_4$ в пересчете на высушенное вещество.

Белый или желтый кристаллический порошок. Практически нерастворим в воде, умеренно растворим в 96% спирте.

Температура плавления: от 158°С до 162°С.

Индофеноловый синий. $C_{18}H_{16}N_2O$. *(М.м.* 276,3). *1045700.* [132-31-0]. Показатель Шульца №939. Индекс цветности №49700. N-[4-(Диметиламино)фенил)]-1,4-нафтохинонмоноимин.

Порошок фиолетово-чёрного цвета. Практически нерастворим в воде.

Хроматография. Определение проводят методом тонкослойной хроматографии *(2.2.27),* используя в качестве тонкого слоя *силикагель GP.* На хроматографическую пластинку наносят 10 мкл раствора 0,1 г/л в *метиленхлориде Р* и хроматографируют в этом же растворителе. Фронт растворителя должен пройти не менее 10 см. На хроматограмме должно обнаруживаться только одно основное пятно. Допускается пятно на старте.

Ионообменная смола сильнокислотная. *1085400.*

Смола в протонированной форме с группами кислоты сульфоновой, присоединенными к решетке, состоящей из полистирола, поперечно сшитого 8% дивинилбензола. Выпускают в виде гранул шарообразной формы; если нет других указаний, размер частиц составляет от 0,3 мм до 1,2 мм.

Емкость. От 4,5 ммоль/г до 5 ммоль/г, при содержании воды от 50% до 60%.

Приготовление колонки. Если нет других указаний, используют трубку с вплавленным внутрь диском из пористого стекла, длиной 400 мм, внутренним диаметром 20 мм и высотой заполнения около 200 мм. Смолу предварительно смешивают с *водой Р,* полученную взвесь вводят в трубку, не допуская образования пузырьков воздуха между частицами. Во время работы жидкость не должна опускаться ниже поверхности смолы.
Если смола в протонированной форме, промывают *водой* Р до тех пор, пока для нейтрализации 50 мл потребуется не более 0,05 мл *0,1М раствора натрия гидроксида,* используя в качестве индикатора 0,1 мл *раствора метилового оранжевого Р.* Если смола в натриевой форме или нуждается в регенерации, через колонку медленно пропускают около 100 мл смеси равных объемов *кислоты хлористоводородной Р1* и *воды Р,* а затем промывают *водой Р,* как описано выше.

Йод. I_2. *(М.м.* 253,8). *1045800.* [7553-56-2].

Содержит не менее 99,5% и не более 100,5% I.

Крохкие пластинки или мелкие кристаллы серовато-фиолетового цвета с металлическим блеском. Очень мало растворим в воде, растворим в 96% спирте, мало растворим в глицерине, очень легко растворим в концентрированных растворах йодидов. Свободно выветривается при комнатной температуре.

Йода раствор Р1. *1045801.*

К 10,0 мл *0,05 М раствора йода* прибавляют 0,6 г *калия йодида Р и* доводят объём раствора *водой* Р до 100,0 мл.

Готовят непосредственно перед использованием.

Йода раствор Р2. *1045802.*

К 10,0 мл *0,05 М раствора йода* прибавляют 0,6 г *калия йодида Р и* доводят объём раствора *водой Р* до 1000,0 мл.

Готовят непосредственно перед использованием.

Йода раствор Р3. *1045803.*

2,0 мл *раствора йода Р1* доводят *водой Р* до объёма 100,0 мл.

Готовят непосредственно перед использованием.

Йода раствор Р4. *1045806.*

14 г *йода Р* растворяют в 100 мл раствора 400 г/л *калия йодида Р,* прибавляют 1 мл *кислоты хлористоводородной разведенной Р* и доводят объём раствора *водой Р* до 1000 мл.

Хранят в защищённом от света месте.

Йода раствор спиртовой. *1045804.* Раствор 10 г/л в *96% спирте Р.*

Хранят в защищённом от света месте.

Йода раствор в хлороформе. *1045805.* Раствор 5 г/л в *хлороформе Р.*

Хранят в защищённом от света месте.

Йодкрахмальная бумага. *1085101.*
Полоски фильтровальной бумаги погружают в 100 мл *раствора крахмала, свободного* от *йодидов, Р,* содержащего 0,1 г *калия йодата Р.* Избыток жидкости удаляют. Сушат в защищённом от света месте.

Йода бромид. IBr. *(М.м.* 206,8). *1045900.* [7789-33-5].

Кристаллы от синевато-чёрного до коричневато-чёрного цвета. Легко растворим в воде, 96% спирте, эфире и кислоте уксусной ледяной.

Температура кипения: около 116°С.

Температура плавления: около 40°С.

Хранят в прохладном, защищённом от света месте.

Йода бромида раствор. *1045901.*

20 г *йода бромида Р* растворяют в *кислоте уксусной ледяной Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 1000 мл.

Хранят в защищённом от света месте.

Йода хлорид. ICl. (*М.м.* 162,4). 1143000. [7790-99-9].

Кристаллы чёрного цвета. Растворяется у воде, кислоте уксусной и 96% спирте.

Йода хлорида раствор. *1143001.*

1,4 г *йода хлорида Р* растворяют в *кислоте уксусной ледяной Р* и доводят объем раствора этой же кислотой до 100 мл.

Хранят в защищенном от света месте.

Йода хлорида раствор Р1.

11,06 г *калия йодата Р* помещают в колбу с притертой пробкой, прибавляют 50 мл *воды Р* и 50 мл *кислоты хлористоводородной Р*, закрывают пробкой и встряхивают до полного растворения йода, образующегося в ходе реакции.

Раствор переносят в делительную воронку и взбалтывают с 10 мл *хлороформа Р*. Когда хлороформный слой окрасится в фиолетовый цвет, прибавляют каплями при энергичном встряхивании раствор 10 г/л *калия йодата Р* до исчезновения окраски хлороформного слоя. Когда хлороформный слой окажется неокрашенным, прибавляют каплями раствор 10 г/л *калия йодида Р* до бледно-розового окрашивания. После отстаивания водный слой сливают в мерную колбу вместимостью 1000,0 мл и доводят объем раствора водой до метки. Полученный раствор должен иметь светло-желтое окрашивание.

Йода (V) оксид перекристаллизированный. I_2O_5. *(М.м.* 333,8).*1046000.*

[12029-98-0]. Дийод пентоксид. Йодный ангидрид.

Содержит не менее 99,5% I_2O_5.

Кристаллический порошок белого цвета или гранулы от белого до серовато-белого цвета. Гигроскопичен, очень легко растворим в воде с образованием HIO_3.

Стабильность при нагревании. 2 г, предварительно выдержанные при температуре 200°С в течение 1 ч, растворяют в 50 мл *воды Р;* раствор должен быть бесцветным.

Количественное определение. 0,100 г йода (V) оксида перекристаллизированного растворяют в 50 мл *воды Р,* прибавляют 3 г *калия йодида Р и* 10 мл *кислоты хлористоводородной разведенной Р.* Титруют высвободившийся йод *0,1 М раствором натрия тиосульфата,* используя в качестве индикатора 1 *мл раствора крахмала Р.*

1 мл *0,1М раствора натрия тиосульфата* соответствует 2,782 мг I_2O_5.

Хранят в воздухонепроницаемом контейнере, в защищённом от света месте.

2-Йодбензойная кислота. $C_7H_5IO_2$. *(М.м.* 248,0). *1046100.* [88-67-5].

Кристаллический порошок от белого до светло-жёлтого цвета. Мало растворима в воде, растворима в 96% спирте.

Температура плавления: около 160°С.
Хроматография. Определение проводят методом тонкослойной хроматографии *(2.2.27),* используя в качестве тонкого слоя *целлюлозу для хроматографии* F_{254} *Р.* На линию старта хроматографической пластинки наносят 20 мкл раствора кислоты 2-йодбензойной, приготовленного растворением 40 мг в 4 мл *0,1 М раствора натрия гидроксида* и разведением *водой Р* до объёма 10 мл. Хроматографируют, используя в качестве подвижной фазы верхний слой, полученный при встряхивании смеси растворителей *вода Р- кислота уксусная ледяная Р - толуол Р* (20:40:40). Когда фронт растворителей пройдет 12 см, пластинку просматривают в УФ-свете при длине волны 254 нм. На хроматограмме должно обнаруживаться только одно основное пятно.

2-Йодгиппуровая кислота. $C_9H_8INO_3{\cdot}2H_2O$. *(М.м.* 341,1). *1046200.* [147-58-0].

2-(2-Йодбензамидо)уксусная кислота.

Кристаллический порошок белого или почти белого цвета. Умеренно растворима в воде.

Температура плавления: около 170°С.

Вода (2.5.12). От 9% до 13%. Определение проводят из 1.000 г.

Хроматография. Определение проводят методом тонкослойной хроматографии *(2.2.27),* используя в качестве тонкого слоя *целлюлозу для хроматографии* F_{254} *Р.* На линию старта хроматографической пластинки наносят 20 мкл раствора

кислоты 2-йодгиппуровой, приготовленного растворением 40 мг в 4 мл *0,1 M раствора натрия гидроксида* и разведением *водой* Р до объёма 10 мл. Хроматографируют, используя в качестве подвижной фазы верхний слой, полученный при встряхивании смеси растворителей *вода Р— кислота уксусная ледяная Р — толуол Р* (20:40:40). Когда фронт растворителей пройдет 12 см, пластинку просматривают в УФ-свете при длине волны 254 нм. На хроматограмме должно обнаруживаться только одно основное пятно.

Йодистоводородная кислота. HI. *(М.м.* 127,9). *1098900.* [10034-85-2].

Кислоту йодистоводородную перегоняют над красным фосфором, пропуская во время перегонки *углерода диоксид Р или азот Р.* Используют бесцветную или почти бесцветную, кипящую при постоянной температуре смесь (от 55% до 58% HI), перегоняющуюся при температуре от 126°Сдо127°С.

Кислоту помещают в небольшие флаконы из стекла коричневого цвета, предварительно продутые углерода диоксидом Р или азотом Р, со стеклянными пробками, герметизируют парафином.

Хранят в защищенном от света месте.

Йодная кислота. H_5IO_6. *(М.м.* 227,9). *1108900.* [10450-60-9].

Кристаллы. Легко растворима в воде, растворима в 96% спирте.

Температура плавления: около 122°С.

Йодной и уксусной кислоты раствор. *1063000.*

0,446 г *натрия перйодата Р* растворяют в 2,5 мл раствора 25 % *(об/об) кислоты серной Р* и доводят объём раствора *кислотой уксусной ледяной Р* до 100,0 мл.

Йодплатината реактив. *1046300.*

К 3 мл раствора 100 г/л *кислоты хлорплатиновой Р* прибавляют 97 мл *воды Р* и 100 мл раствора 60 г/л *калия йодида Р.*

Хранят в защищённом от света месте.

Йодсернистый реактив. *1046400.* # Реактив Фишера.

Устройство для приготовления реактива, состоящее из круглодонной колбы вместимостью 3000-4000 мл с тремя входными отверстиями для мешалки, термометра и трубки, заполненной осушителем, должно быть закрытым и сухим в процессе подготовки. В колбу помещают 700 мл *пиридина безводного Р* и 700 мл *монометилового эфира этиленгликоля Р,* прибавляют при постоянном перемешивании 220 г мелкоизмельченного *йода Р,* предварительно высушенного над *фосфора(V) оксидом Р.* Перемешивание продолжают до полного растворения йода (около 30 мин), затем охлаждают колбу до температуры -10°С и быстро прибавляют при постоянном перемешивании 190 г *серы диоксида Р* Температура реакционной смеси не должна превышать 30°С. Охлаждают.

Установка титра. Около 20 *мл метанола безводного Р* помещают в сосуд для титрования и титруют приготовленным иодсернистым реактивом *(2.5.12, определение воды).* Прибавляют точно взвешенное достаточное количество *воды Р* и повторяют определение воды. Вычисляют количество воды, в миллиграммах, соответствующее 1 мл йодсернистого реактива.

1 мл йодсернистого реактива соответствует как минимум 3,5 мг воды.

Должны быть приняты меры предосторожности для предотвращения воздействия на растворы атмосферной влаги. Титр устанавливают непосредственно перед использованием.

Хранят в сухом контейнере.

Йодуксусная кислота. $C_2H_3IO_2$. *(М.м.* 185,9). *1107000.* [64-69-7].

Бесцветные или белого цвета кристаллы. Растворима в воде и 96% спирте.

Температура плавления: от 82°С до 83°С.

5-Йодурацил. $C_4H_3IN_2O_2$ *(М.м.* 238,0). *1046500.* [696-07-1]. 5-Йод-1Н,3Н-пиримидин-2,4-дион.

Температура плавления: около 276°С с разложением.

Хроматография. Определение проводят, как указано в статье *Йодоксиуридин,* на хроматографическую пластинку наносят 5 мкл раствора 0,25 г/л; на полученной хроматограмме должно быть только одно основное пятно.

Йодэтан. C_2H_5I. *(М.м.* 155,9). *1099100.* [75-03-6],
Жидкость от бесцветного до слегка желтоватого цвета, под действием воздуха и света темнеет. Смешивается с 96% спиртом и большинством: органических растворителей.

d_{20}^{20}: около 1,95.

n_D^{20}: около 1,513.

Температура кипения: около 72°С.

Хранят в воздухонепроницаемом контейнере.

Кадмий. *Cd.(А.м.* 112,4). *1014100.* [10108-64-2].

Блестящий металл серебристо-белого цвета. Практически не растворим в воде, легко растворим в кислоте азотной и горячей кислоте хлористоводородной.

Казеин. *1016600.* [9000-71-9].

Смесь родственных фосфопротеинов, полученных из молока.

Аморфный порошок или гранулы белого цвета. Очень мало растворим в воде и неполярных органических растворителях, растворим в кислоте хлористоводородной концентрированной с образованием бледно-фиолетового окрашивания. Образует соли с кислотами и основаниями. Изоэлектрическая точка казеина находится при значении pH около 4,7. Щелочные растворы имеют левое вращение плоскости поляризации.

Калий железистосинеродистый. См. *Калия ферроцианид.*

Калий железосинеродистый. См. *Калия феррицианид.*

Калия бикарбонат. $KHCO_3$. *(М.м.* 100,1). *1069900.* [298-14-6]. Калия гидрокарбонат.

Белый кристаллический порошок или бесцветные кристаллы. Легко растворим в воде, практически нерастворим в 96% спирте. При нагревании при высушивании или в растворе постепенно переходит в карбонат.

Содержит не менее 99,0% и не более 101,0% $KHCO_3$.

Калия бикарбоната раствор насыщенный, метанольный. *1069901.* См. *Калия гидрокарбоната раствор насыщенный, метанольный.*

Калия бихромат. См. *Калия дихромат.*

Калия бромат. $KBrO_3$. *(М.м.* 167,0). *1068700.* [7758-01-2].

Кристаллы или гранулированный порошок белого цвета. Растворим в воде, мало растворим в 96% спирте.

Калия бромид. KBr. *(М.м.* 119,0). *1068800.* [7758-02-3].

Содержит не менее 98,0% и не более 100,5% KB в пересчете на сухое вещество.

Кристаллический порошок белого цвета или бесцветные кристаллы. Легко растворим в воде и глицирине, мало растворим в 96% спирте.

Калия бромид, используемый в инфракрасной абсорбционной спектрофотометрии (2.2.24), должен выдерживать следующее дополнительное испытание.

ИК-спектр диска калия бромида, толщиной 2 мм, предварительно высушенного при температуре 250°C в течение 1 ч, должен иметь практически ровную базовую линию в интервале длин волн от 4000 $см^{-1}$ до 620 $см^{-1}$. Не должен иметь максимумов с поглощением более 0.02 над базовой линией, за исключением максимумов для воды при длинах волн 3440 $см^{-1}$ и 1630 $см^{-1}$.

Калия гидрокарбонат. $KHCO_3$. *(М.м.* 100,1). *1069900.* [298-14-6]. Калия бикарбонат.

Прозрачные, бесцветные кристаллы. Легко растворим в воде, практически нерастворим в 96% спирте.

Калия гидрокарбоната раствор насыщенный, метанольный. *1069901.*

0,1 г *калия гидрокарбоната Р* растворяют в 0,4 мл *воды Р* при нагревании на водяной бане, прибавляют 25 мл *метанола Р* и перемешивают круговыми движениями, продолжая нагревание до растворения.

Готовят непосредственно перед использованием.

Калия гидроксид. KOH. *(М.м.* 56,11). *1070300.* [1310-58-3].

Содержит не менее 85,0% и не более 100,5% суммы щелочей в перечсете на KOH.

Твердая кристаллическая масса белого цвета в виде палочек, пластинок или бесформенных кусочков. Расплывается на воздухе. Гигроскопична. Очень легко растворим в воде, легко растворим в 96% спирте.

Хранят в воздухонепроницаемом контейнере.

Калия гидроксида 2 М раствор спиртовой. *1070301.*

12 г *калия гидроксида Р* растворяют в 10 мл *воды Р* и доводят объём раствора *96% спиртом Р по* 100 мл.

Калия гидроксида 0.5 М раствор спиртовой (10%, *об/об). 1070302.*

28 г *калия гидроксида Р* растворяют в 100 мл *96% спирта Р* и доводят объём раствора *водой Р до 1000 мл.*

Калия гидроксида раствор спиртовой. *1070303.*

3 г *калия гидроксида Р* растворяют в 5 мл *воды Р* и доводят объём раствора 96% *спиртом, свободным от альдегидов,* Р до 100 мл. Декантируют прозрачный раствор. Раствор должен быть почти бесцветным.

Калия гидроксида раствор спиртовой Р1. *1070304.*

6,6 г *калия гидроксида Р* растворяют в 50 мл *воды Р* и доводят объём раствора *этанолом* Р до 1000мл.

Калия гидросульфат. $KHSO_4$. *(М.м.* 136,2). *1070100.* [7646-93-7]. Калия бисульфат.

Прозрачные, бесцветные, гигроскопичные кристаллы. Легко растворим в воде с образованием сильно кислого раствора.

Хранят в воздухонепроницаемом контейнере.

Калия гидротартрат. $C_4H_5KO_6$. *(М.м.* 188,2). *1070200.* [868-14-4].

Калия гидро(2R, 3R)-2,3-ди-гидроксибутан-1,4-диоат.

Кристаллический порошок белого цвета или бесцветные, слегка матовые кристаллы. Мало растворим в воде, растворим в кипящей воде, очень мало растворим в 96% спирте.

Калия гидрофталат. $C_8H_5KO_4$. *(М.м.* 204,2). *1070000.* [877-24-7].

Калия гидробензол-1,2-дикарбоксилат.

Кристаллы белого цвета. Растворим в воде, мало растворим в 96% спирте.

Калия гидрофталата 0,2 М раствор. *1070001.*

Раствор *калия гидрофталата Р* содержит 40,84 г, в пересчете на $C_8H_5KO_4$, в 1000,0 мл.

Калия дигидрофосфат. KH_2PO_4. *(Мм.* 136,1). *1069600.* [7778-77-0].

Содержит не менее 98,0% и не более 100,5% KH_2PO_4 в пепесчете на сухое вещество.

Кристаллический порошок белого цвета или бесцветные кристаллы. Легко растворим в воде, прикатически нерастворим в 96% спирте.

Калия дигидрофосфата 0,2 М раствор. *1069601.*

Раствор *калия дигидрофосфата Р* содержит 27,22 г, в пересчете на KH_2PO_4, в 1000,0 мл.

Калия дихромат. $K_2Cr_2O_7$. *(Мм.* 294,2). *1069500.* [7778-50-9]. Дикалия дихромат. Калия бихромат.

Калия дихромат, используемый для калибровки спектрофотометров *(2.2.25),* должен содержать не менее 99,9% $K_2Cr_2O_7$, в пересчёте на сухое вещество, высушенное при температуре 130°С.

Кристаллы оранжево-красного цвета. Растворим в воде, практически не растворим в 96% спирте.

Количественное определение. 1,000 г калия дихромата растворяют в *воде Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 250,0 мл. 50,0 мл полученного раствора помещают в колбу вместимостью 500 мл прибавляют свежеприготовленный раствор, состоящий из 4 г *калия йодида Р,* 2 г *натрия гидрокарбоната* Р и 6 мл *кислоты хлористоводородной Р в* 100 мл *воды Р.* Колбу закрывают пробкой, выдерживают в защищённом от света месте в течение 5 мин и титруют *0,1 М раствором натрия тиосульфата,* используя в качестве индикатора 1 мл *раствора крахмала, свободного от йодидов, Р.*

1 *мп 0,1 М раствора натрия тиосульфата* соответствует 4,903 мг $K_2Cr_2O_7$.

Калия дихромата раствор. *1069501.* Раствор 106 г/л.

Калия дихромата раствор Р1. *1069502.* Раствор 5 г/л.

Калия йодат. KIO_3. *(М.м.* 214,0). *1070400.* [7758-05-6].

Кристаллический порошок белого цвета. Растворим в воде.

Калия йодид. KI. *(М.м.* 166,0). *1070500.* [7681-11-0].

Содержит не менее 99,0% и не более 100,5% KI в пересчете на сухое вещество.

Порошок белого цвета или бесцветные кристаллы. Очень легко растворим в воде, легко растворим в глицерине, растворим в 96% спирте.

Хранят в защищенном от света месте.

Калия йодида раствор. *1070502.* Раствор 166 г/л.

Калия йодида раствор Р1. Раствор 100 г/л.

Калия йодида йодированный раствор. *1070503.*

2 г йода Р и 4 г *калия йодида Р* растворяют в 10 мл *воды Р,* после полного растворения доводят объём раствора *водой* Р до 100 мл.

Калия йодида насыщенный раствор. *1070504.*

Насыщенный раствор *калия йодида Р* в *воде, свободной от углерода диоксида, Р,* должен содержать нерастворённые кристаллы.

0,5 мл насыщенного раствора калия йодида смешивают с 30 мл смеси *хлороформ Р - кислота уксусная Р* (2:3), прибавляют 0,1 мл *раствора крахмала Р;* если появляется синее окрашивание, оно должно исчезнуть при прибавлении 0,05 мл *0,1 М раствора натрия тиосульфата.*

Хранят в защищённом от света месте.

Калия йодовисмутата раствор. *1070600.*

К 0,85 г *висмута нитрата основного Р* прибавляют 40 мл *воды* Р, 10 мл *кислоты уксусной ледяной Р* и 20 мл раствора 400 г/л *калия йодида Р.*

Калия йодовисмутата раствор Р1.*1070601.*

100 г *кислоты винной Р* растворяют в 400 мл *воды Р,* прибавляют 8,5 г *висмута нитрата основного Р,* встряхивают в течение 1 ч, прибавляют 200 мл раствора 400 г/л *калия йодида Р* и энергично встряхивают. Выдерживают 24 ч и фильтруют.

Хранят в защищённом от света месте.

Калия йодовисмутата раствор Р2.*1070602.*

Исходный раствор. Суспендируют 1,7 г *висмута нитрата основного Р* и 20 г *кислоты винной Р* в 40 мл *воды Р.* К суспензии прибавляют 40 мл раствора 400 г/л *калия йодида Р,* встряхивают в течение 1 ч и фильтруют.

Срок годности раствора несколько дней, при хранении во флаконах оранжевого стекла.

Раствор для опрыскивания. Непосредственно перед использованием смешивают 5 мл исходного раствора с 15 мл *воды Р.*

Калия йодовисмутата раствор разведенный. *1070603.*

100 г *кислоты винной Р* растворяют в 500 мл *воды* Р и прибавляют 50 *мл раствора калия йодовисмутата Р1.*

Хранят в защищённом от света месте.

Калия карбонат. K_2CO_3. *(М.м.* 138,2). *1068900.* [584-08-7]. Дикалия карбонат.

Гранулированный порошок белого цвета; гигроскопичен. Очень легко растворим в воде, практически не растворим в этаноле.

Хранят в воздухонепроницаемом контейнере.

Калия 1,2-Нафтохинон –4-сульфонат. См. *1,2-Нафтохинон-4-сульфонат калия.*

Калия-натрия тартрат. $C_4H_4KNaO_6 \cdot 4H_20$ *(М.м.* 282,2). *1083500.* [6381-59-5].

Калий-натрий виннокислый. # Сеньетова соль.

Бесцветные призматические кристаллы. Очень легко растворим в воде.

Калия нитрат. $KN0_3$. *(М.м.* 101,1). *1070700.* |7757-79-1].

Бесцветные кристаллы. Очень легко растворим в воде.

Калия перйодат. KIO_4. *(М.м.* 230,0). *1070800.* [7790-21-8].

Кристаллический порошок белого цвета или бесцветные кристаллы. Растворим в воде.

Калия ферриперйодата раствор. *1070801.*

1 г *калия перйодата Р* растворяют в 5 мл свежеприготовленного раствора 120 г/л *калия гидроксида Р,* прибавляют 20 мл *воды Р* и 1,5 *мл раствора железа (III) хлорида Р1,* доводят свежеприготовленным раствором 120 г/л *калия гидроксида Р до* объёма 50 мл.

Калия перманганат. $KMnO_4$. *(М.м.* 158,0). *1070900.* [7722-64-7].

Содержит не менее 99,0 и не более 100,5% $KMnO_4$.

Гранулированный порошок темно-фиолетового или коричнево-черного цвета или кристаллы темно-фиолетового или почти черного цвета, обычно с металлическим блеском. Растворим в холожной воде, легко растворим в кипящей воде.

При взаимодействии с некоторыми органическими веществами или легкоокисляющимися веществами, возможен взрыв.

Калия перманганата раствор в кислоте фосфорной. *1070901.*

3 г *калия перманганата* Р растворяют в смеси 15 мл *кислоты фосфорной* Р и 70 мл *воды Р,* доводят объём раствора *водой* Р до 100 мл.

Калия перманганата раствор. *1070902.*

Раствор 30 г/л.

Калия перренат. $KReO_4$. *(М.м.* 289,3). *1071000.* |10466-65-6].

Кристаллический порошок белого цвета. Растворим в воде, мало растворим в 96% спирте, метаноле и пропиленгликоле.

Калия персульфат. $K_2S_2O_8$. *(М.м.* 270,3). *1071100.* [7727-21-1]. Дикалия пероксидисульфат.

Бесцветные кристаллы или кристаллический порошок белого цвета. Умеренно растворим в воде, практически нерастворим в 96% спирте. Водные растворы разлагаются при комнатной температуре, быстрее - при нагревании.

Хранят в прохладном месте.

Калия пироантимонат. $KSb(OH)_6$. *(М.м.* 262,9). *1071300.* [12208-13-8]. Калия гексагидроксоантимониат.

Кристаллы или кристаллический порошок белого цвета. Умеренно растворим в воде.

Калия пироантимоната раствор. *1071301.*

2 г *калия пироантимоната Р* растворяют в 95 мл горячей *воды Р,* быстро охлаждают, прибавляют раствор, содержащий 2,5 г *калия гидроксида Р* в 50 мл

воды Р, и 1 мл *раствора натрия гидроксида разведенного Р.* Выдерживают в течение 24 ч, фильтруют и доводят *водой Р* до объёма 150 мл.

Калия плюмбита раствор. *1071200.*

1,7 г *свинца (II) ацетата Р,* 3,4 г *калия цитрата Р* и 50 г *калия гидроксида Р* растворяют в *воде Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 100мл.

Калия сульфат. K_2SO_4. *(М.м.* 174,3). *1033100.* [7778-80-5]. Дикалия сульфат.

Бесцветные кристаллы. Растворим в воде.

Калия тартрат. $C_4H_4K_2O_6 \cdot 1/2H_2O$. *(М.м.* 235,3). *1071400.* [921-53-9]. Дикалия(2R,3R)-2,3-дигидроксибутан-1,4-дикарбоксилат гемигидрат. Калий виннокислый. Калий щавелевокислый.

Гранулированный порошок или кристаллы белого цвета. Очень легко растворим в воде, очень мало растворим в 96% спирте.

Калия тетрайодомеркурата раствор. *1071500.*

1,35 г *ртути (II) хлорида Р* растворяют в 50 *мл воды Р,* прибавляют 5 г *калия йодида Р* и доводят объём раствора водой *Р* до 100 мл.

Калия тетрайодомеркурата щелочной раствор.*1071600.* Реактив Несслера.

11 г *калия йодида Р* и 15 г *ртути (II) йодида Р* растворяют в *воде Р,* доводят объём раствора тем же растворителем до 100 мл. Непосредственно перед использованием полученный раствор смешивают с раствором 250 г/л *натрия гидроксида Р* (1:1).

К 10 мл раствора 1000 г/л *калия йодида Р* постепенно прибавляют при постоянном перемешивании насыщенный раствор *ртути (II) хлорида Р* до появления неисчезающего красного осадка. Прибавляют 30 г *калия гидроксида Р* и после растворения его – еще 1 мл насыщенного раствора *ртути (II) хлорида*. Разбавляют *водой Р* до 200 мл, дают отстояться и прозрачную жидкость сливают.

Калия тетраоксалат. $C_4H_3KO_8 \cdot 2H_2O$. *(М.м.* 254,2). *1071700.* [6100-20-5].

Кристаллический порошок белого цвета. Умеренно растворим в воде, растворим в кипящей воде, мало растворим в 96% спирте.

Калия тиоцианат. KSCN. *(М.м.* 97,2). *1071800.* [333-20-0].

Бесцветные кристаллы, расплывающиеся на воздухе. Очень легко растворим в воде и 96% спирте.

Хранят в воздухонепроницаемом контейнере.

Калия тиоцианата раствор. *1071801.*

Раствор 97 г/л.

Калия феррицианид. $K_3[Fe(CN)_6]$. *(М.м.* 329,3). *1069700.* [13746-66-2]. Калия гексацианоферрат(III). # Калий железосинеродистый. Красная кровяная соль.

Кристаллы красного цвета. Легко растворим в воде.

Калия феррицианида раствор. *1069701.*

Промывают 5 г *калия феррицианида Р* небольшим количеством *воды Р,* растворяют в *воде Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 100 мл.

Готовят непосредственно перед использованием.

Калия ферроцианид. $K_4[Fe(CN)_6]\cdot 3H_2O$. *(М.м.* 422,4). *1069800.* [14459-95-1]. Калия гексацианоферрат (II). # Калий железистосинеродистый. Желтая кровяная соль.

Прозрачные кристаллы жёлтого цвета. Легко растворим в воде, практически нерастворим в 96% спирте.

Калия ферроцианида раствор. *1069801.*

Раствор 53 г/л.

Калия хлорат. $KClO_3$. *(М.м.* 122,6). *1069000.* [3811-04-9].

Порошок или гранулы, или кристаллы белого цвета. Растворим в воде.

Калия хлорид. KCl. *(М.м.* 74,6). *1069100.* [7447-40-7].

Содержит не менее 99,0% и не более 100,5% KCl в пересчете на сухое вещество.

Кристаллический порошок белого цвета или бесцветные кристаллы. Легко растворим в воде, практически нерастворим в этаноле.

Калия хлорид, используемый для инфракрасной абсорбционной спектрофотометрии (2.2.24), должен выдерживать следующее дополнительное требование.

ИК-спектр диска калия хлорида толщиной 2 мм, предварительно высушенного при температуре 250°С в течение 1 ч, должен иметь практически ровную базовую линию в интервале длин волн от 4000 $см^{-1}$ до 620$см^{-1}$. Не должен иметь максимумов с поглощением более 0,02 над базовой линией, за исключением максимумов для воды при длинах волн 3440 $см^{-1}$ и 1630 $см^{-1}$.

Калия хлорида 0,1 М раствор. *1069101.*

Раствор *калия хлорида Р* содержит 7,46 г KCl, в пересчете на KCl, в 1000,0 мл.

Калия хромат. K_2CrO_4. *(М.м.* 194,2). *1069200.* [7789-00-6]. Дикалия хромат. # Калия бихромат.

Кристаллы жёлтого цвета. Легко растворим воде.

Калия хромата раствор. *1069201.* Раствор 50 г/л.

Калия цианид. KCN. *(М.м.* 65,1). *1069400.* [151-50-8].

Кристаллический порошок или масса, или гранулы белого цвета. Легко растворим в воде, мало растворим в 96% спирте.

Калия цианида раствор. *1069401.* Раствор 100 г/л.

Калия цитрат. $C_6H_5K_3O_7\cdot H_2O$. *(М.м.* 324,4). *1069300.* [6100-05-6].

Трикалия 2-гидроксипропан-1,2,3-трикарбоксилат.

Содержит не менее 99,0% и не более 101,0% $C_6H_5K_3O_7$ в пересчете на безводное вещество.

Гранулированный порошок белого цвета или бесцветные кристаллы. Гигроскопичен. Очень легко растворим в воде, практически нерастворим в 96% спирте.

Вода (2.5.12). От 4,0% до 7,0%. Определение проводят из 0,500 г субстанции полумикрометодом. После добавления субстанции перед титрованием смесь перемешивают продолжительностью 15 мин.

Кальконкарбоновая кислота. $C_{21}H_{14}N_2O_7S{\cdot}3H_20$. *(М.м.* 492,5). *1015300.* [3737-95-9]. 2-Гидрокси-1-(2-гидрокси-4-сульфо-1 -нафтилазо)нафталин-3 карбоновая кислота.

Порошок коричневато-чёрного цвета. Мало растворима в воде, очень мало растворима в ацетоне и 96% спирте, умеренно растворима в разведенных растворах натрия гидроксида.

Кальконкарбоновой кислоты индикаторная смесь. *1015301.*

Смешивают одну часть *кальконкарбоновой кислоты Р с 99* частями *натрия хлорида Р.*

Испытание на чувствительность. 50 мг индикаторной смеси кальконкарбоновой кислоты растворяют в смеси 2 мл *раствора натрия гидроксида концентрированного Р* и 100 *мл воды Р;* появляется голубое окрашивание, которое переходит в фиолетовое при прибавлении 1 мл раствора 10 г/л *магния сульфата Р* и 0,1 мл раствора 1,5 г/л *кальция хлорида Р;* при прибавлении 0,15 мл *0,01 М раствора натрия эдетата* вновь появляется голубое окрашивание.

Кальция гидроксид. $Ca(OH)_2$. *(М.м.* 74,1). *1015000.* [1305-62-0]. Кальция дигидроксид.

Порошок белого цвета. Почти полностью растворим в 600 частях воды.

Кальция гидроксида раствор. *1015001.* Свежеприготовленный насыщенный раствор.

Кальция карбонат. $CaCO_3$. *(М.м.* 100,1). *1014500.* [471-34-1].

Содержит не менее 98,5% и не более 100,5% $CaCO_3$ в пересчете на сухое вещество.

Порошок белого цвета. Практически нерастворим в воде.

Потеря в массе при высушивании (2.2.32). Не более 2,0%. 1,000 г субстанции сушат при температуре 200°С.

Кальция карбонат Р1.*1014501.*

Должен выдерживать требования для *кальция карбоната Р* и следующее дополнительное испытание.

Хлориды (2.4.4). Не более 50 ppm.

Кальция лактат. $C_6H_{10}CaO_6$~$\cdot 5H_2O$. *(М.м.* 218,2 безводное вещество). *1015100.* [41372-22-9]. Кальция лактат пентагидрат. Кальция бис(2-гидроксипропаноат) или смесь кальция (*R*)-, (*S*)- и (RS)-2-гидроксипропионатов.

Содержит не менее 98,0% и не более 102,0% $C_6H_{10}CaO_6$·в пересчете на сухое вещество.

Кристаллический или гранулированный порошок белого или почти белого цвета. Слегка выветривается. Растворим в воде, легко растворим в кипящей воде, очень мало растворим в 96% спирте. Имеет энантиомер.

Вода: не менее 22,0% и не более 27,0%,. определенная потерей в массе при высушивании (*2.2.32*). 0,500 г субстанции сушат при температуре 125°С.

Кальция оксид. CaO. *(М.м. 56,08*). Известь жженая.

Белые куски или порошок, слипающийся в комки. На воздухе поглощает воду и углерода диоксид.

Кальция сульфат. $CaSO_4 \cdot l/2H_2O$. *(М.м.* 145,1). *1015200.* [10034-76-1]. Кальция сульфат гемигидрат.

Порошок белого цвета. Растворим примерно в 1500 частях воды, практически нерастворим в 96% спирте. При смешивании с водой, масса которой равна половине массы кальция сульфата, порошок быстро затвердевает, превращаясь в твердую пористую массу.

Кальция сульфата раствор. *1015201.*

5 г *кальция сульфата Р* взбалтывают со 100 мл *воды Р* в течение 1 ч и фильтруют.

Кальция хлорид. $CaCl_2 \cdot 2H_2O$. *(М.м.* 147,0). *1014600.* [10035-04-8]. Кальция хлорид дигидрат.

Содержит не менее 97,0% и не более 103,0% $CaCl_2 \cdot 2H_2O$.

Кристалличеий порошок белого цвета. Гигроскопичен. Легко растворим в воде, растворим в 96% спирте.

Хранят в воздухонепроницаемом контейнере.

Кальция хлорида раствор. *1014601.* Раствор 73,5 г/л.

Кальция хлорида 0,01 М раствор. *1014602.*

0,147 г *кальция хлорида Р* растворяют в *воде Р* и доводят объем раствора тем же растворителем до 100,0 мл.

Кальция хлорида 0,02 М раствор. *1014603.*

2,94 г *кальция хлорида Р* растворяют в 900 мл *воды Р,* устанавливают pH раствора в пределах от 6,0 до 6,2 и доводят объем раствора *водой Р до* 1000,0 мл.

Хранят при температуре от 2°С до 8°С.

Кальция хлорид Р1. $CaCl_2 \cdot 4H_2O$. *(М.м.* 183,1). *1014700.* Кальция хлорид тетрагидрат.

Содержит не более 0,05 ppm Fe.

Кальция хлорид. $CaCl_2 \cdot 6H_2O$. *(М.м.* 219,1). Кальция хлорид гексагидрат.

Кристаллическая масса белого цвета или бесцветные кристаллы. Очень легко растворим в воде, легко растворим в 96% спирте. Замерзает при температуре около 29°С.

Содержит не менее 97,0% и не более 103,0% $CaCl_2 \cdot 6H_2O$.

Кальция хлорид безводный. $CaCl_2$. *(М.м.* 111,0). *1014800.* [10043-52-4].

Содержит не менее 98,0% $CaCl_2$, в пересчете на сухое вещество.

Гранулы белого цвета, расплывающиеся на воздухе. Очень легко растворим в воде, легко растворим в 96% спирте и метаноле.

Потеря в массе при высушивании (2.2.32). Не более 5,0%. Определение проводят в сушильном шкафу при температуре 200°С.

Хранят в воздухонепроницаемом контейнере, защищая от воздействия влаги.

Камедь бобов рожкового дерева. *1104500.* Измельченный эндосперм фруктовых косточек *Ceratonia siliqua L. Taub.*

Порошок белого цвета, содержащий от 70% до 80% растворимой в воде смолы, состоящей в основном из галактоманногликона.

Камфора. $C_{10}H_{16}O$. *(М.м.* 152,2). *1113000.* [76-22-2]. (1*RS*, 4*SR*)-1,7,7-триметилбицикло [2.2.1]гептан-2-он. Камфора рацемическая.

Кристаллический порошок или рыхлая кристаллическая масса белого цвета. Легко летучая даже при комнатной температуре. Мало растворима в воде, очень легко растворима в 96% спирте, эфире и петролейном эфире. Легко растворима в жирных маслах, очень мало растворима в глицерине. Имеет энантиомер.

Оптическое вращение (2.2.7). От +0,15°С до –0,15°С. Определение проводят, используя раствор100 г/л субстанции в 96% спирте.

Камфора, используемая в газовой хроматографии, должна выдерживать следующее дополнительное испытание.

Количественное определние. Проводят методом газовой хроматографии *(2.2.28),* как указано в статье *Масло лавандовое.*

Испытуемый раствор. 10 г/л раствор испытуемой субстанции в *гексане Р.*

Площадь основного пика должна быть не менее 98,0% суммы площадей всех пиков, за исключением пика гексана.

Хранят в плотно укупоренном контейнере.

(1S)-(+)10-Камфоросульфоновая кислота. $C_{10}H_{16}O_4S$. *(М.м.* 232,3). *1104100.* [3144-16-9]. (1S,4R)-(+)-2-Оксо-10-борненсульфоновая кислота. [(1S)-7,7-Диметил-2-оксобицикло[2.2.1]-гептан-1-ил]метансульфоновая кислота. Кислота Рейхлера.

Содержит не менее 99,0% (1S)-(+)10-камфоросульфоновой кислоты.

Кристаллы в виде призм. Гигроскопична, растворима в воде.

Температура плавления: около 194°С с разложением.

$[\alpha]_D^{20}$: +20°±1°. Определение проводят, используя раствор 43 г/л в *воде Р.*

ΔA *(2.2.41):* $10{,}2\cdot10^3$. Определение проводят при длине волны 290,5 нм, используя раствор 1,0 г/л.

Каолин легкий. *1047400.* [1332-58-7].

Очищенный природный алюмосиликат гидратированный. Содержит подходящий диспергатор.

Легкий порошок белого цвета, не содержащий твердых спекшихся частиц, маслянистый на ощупь. Практически нерастворим в воде и минеральных кислотах.

Крупные частицы. Не более 0,5%. 5,0 г каолина помещают в цилиндр с притертой стеклянной пробкой длиной около 160 мм и диаметром 35 мм, прибавляют 60 мл раствора 10 г/л *натрия пирофосфата Р,* энергично встряхивают и отстаивают в течение 5 мин. С помощью пипетки отбирают 50 мл жидкости на уровне около 5 см ниже поверхности и отбрасывают. К оставшейся жидкости прибавляют 50 мл *воды Р,* встряхивают, отстаивают в течение 5 мин и удаляют 50 мл, как описано выше. Эту операцию повторяют до тех пор, пока не будет удалено в общей сложности 400 мл. Переносят оставшуюся суспензию в чашку для выпаривания, выпаривают на водяной бане досуха и сушат до постоянной массы при температуре от 100°С до 105°С. Масса остатка должна быть не более 25 мг.

Мелкие частицы. 5,0 г каолина диспергируют в 250 мл *воды Р* при энергичном встряхивании в течение 2 мин и тотчас выливают в стеклянный цилиндр диаметром 50 мм. С помощью пипетки отбирают 20 мл, помещают в фарфоровую чашку, выпаривают на водяной бане досуха и сушат до постоянной массы при температуре от 100°С до 105°С. Остаток суспензии отстаивают при температуре 20°С в течение 4 ч и с помощью пипетки удаляют 20 мл на уровне точно 5 см ниже поверхности, не взмучивая осадок. Остаток помещают в фарфоровую чашку,

выпаривают досуха и сушат до постоянной массы при температуре от 100°C до 105°C. Масса второго остатка должна быть не менее 70% от массы первого остатка.

Каприловый спирт. 1024700. *См. .Деканол.*

Карбазол. $C_{12}H_9N$. *(М.м.* 167,2). *1015400.* [86-74-8]. Дибензопиррол.

Кристаллы. Практически нерастворим в воде, легко растворим в ацетоне, мало растворим в этаноле.

Температура плавления: около 245°C.

Карбамид. См. *Мочевина.*

Карбомер. *1015500.* [9007-20-9].

Поперечно-сшитый полимер акриловой кислоты, после высушивания при температуре 80°C в течение 1 ч содержит большое количество карбоксильных групп (CO_2H, от 56% до 68%).

Средняя молекулярная масса около $3{\cdot}10^6$.

pH (2.2.3). Около 3. Измеряют pH суспензии 10 г/л.

Карбофенотион. $C_{11}H_{16}ClO_2PS_3$. *(М.м.* 342,9). *1016200.* [786-19-6]. O,O-Диэтил-S-[[(4-хлорфенил)тио]метил]-фосфордитиоат.

Жидкость желтоватого цвета. Практически нерастворим в воде, смешивается с органическими растворителями.

d_4^{25}*:* около 1,27.

Карвакрол. $C_{10}H_{14}O$. *(М.м.* 150,2). *10164001* [499-75-2]. 5-Изопропил-2-метилфенол.

Жидкость коричневатого цвета. Практически нерастворим в воде, очень легко растворим в 96% спирте и эфире.

d_{20}^{20}: около 0,975.

n_D^{20}: около 1,523.

Температура кипения: около 237°C.

Карвакрол, используемый в газовой хроматографии, должен выдерживать следующее дополнительное испытание.

Количественное определение. Проводят методом газовой хроматографии *(2.2.28),* как указано в статье *Масло мяты перечной.*

Испытуемый раствор. 0,1 г растворяют в 10 мл *ацетона Р.*

На хроматограмме испытуемого раствора площадь основного пика должна быть не менее 95,0% суммы площадей всех пиков, за исключением пика ацетона.

Карвон. $C_{l0}H_{l4}0$.*(М.м.* 150,2). *1016500.* [2244-16-8].

(S)-n-Мента-6,8-диен-2-он. (+)-2-Метил-5-(1-| метилэтенил)циклогекс-2-енон.

Жидкость. Практически не растворим в воде, смешивается с 96% спиртом.

d_{20}^{20}: около 0,965.

n_D^{20}*:* около 1,500.

$[a]_D^{20}$: около +61°.

Температура кипения: около 230°C.

Карвон, используемый в газовой хроматографии должен выдерживать следующее дополнительное испытание.

Количественное определение. Проводят методом газовой хроматографии *(2.2.28),* как указано, в статье *Масло мяты перечной,* используя карвон в качестве испытуемого раствора.

Площадь основного пика должна быть не менее 98,0% суммы площадей всех пиков

Катехин. $C_{15}H_{14}O_6 \cdot xH_2O$. *(М.м.* 290,3, для безводного). *1119000.* [154-23-4]. (+)-(2R,3S)-2-(3,4-Дигидроксифенил)-3,4-дигидро-2Н-хромен-3,5,7-триол. Катехол. Цианиданол. Цианидол.

Катионит слабоосновный. *1096000.* См. *Катионит слабый.*

Катионит слабый. *1096000.*

Смола полиметакриловая, слабо кислая, содержащая карбоксильные группы в протонированной форме.

Размер частиц: от 75 мкм до 160 мкм. Используемые пределы pH: от 5 до 14.

Максимальная температура использования 120°С.

Катионообменная смола. *1016700.*

Смола в протонированной форме с группами сульфоновой кислоты, присоединёнными к решетке полимера, состоящего из полистирола поперечно-сшитого 8% дивинилбензола. Выпускают в виде гранул, размер которых указывают после названия реактива в испытаниях, в которых он используется.

Катионообменная смола Р1. *1121900.*

Смола в протонированной форме с группами сульфоновой кислоты, присоединёнными к решетке полимера, состоящего из полистирола поперечно-сшитого 4% дивинилбензола. Выпускают в виде гранул, размер которых указывают после названия реактива в испытаниях, в которых он используется.

Катионообменная смола сильная (кальциевая форма). *1104600.*

Смола в кальциевой форме с группами сульфоновой кислоты, присоединёнными к решетке полимера, состоящего из полистирола поперечно-сшитого 8% дивинилбензола. Размер частиц указывают после названия реактива в частных статьях.

Католит для изоэлектрофокусировки pH от 3 до 5 (0,1 М раствор β-аланина). *1113100.*

8,9 г *β-аланина Р* растворяют в *воде Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 1000 мл.

Квасцы. См. *Алюминия-калия сульфат.*

Кетостеариловый спирт. *1017500.* [67762-27-0]. Спирт кетостеариловый.

Кетостеариловый спирт – смесь твердых алифатических спиртов. Содержит не менее 40,0% стеарилового спирта ($C_{18}H_{38}O$; *М.м.* 270,5) и в сумме цетиловый спирт ($C_{16}H_{34}O$; *М.м.* 242,4) и стеариловый спирт не менее 90,0%.

Белая или бежево-желтая воскообразная масса, пластины, хлопья или гранулы. Практически нерастворим в воде, легко растворим в эфире, растворим в 90% (*об/об*) спирте и петролейном эфире. При плавлении смешивается с жирными маслами, жидким парафином и расплавленным ланолином.

Кизельгур G. *1047600.*

Состоит из кизельгура, обработанного кислотой хлористоводородной и кальцинированного прибавлением около 15% кальция сульфата полугидрата.

Мелкий порошок серовато-белого цвета; при растирании с водой серый цвет становится более выраженным. Средний размер частиц от 10 мкм до 40 мкм.

Кальция сульфат. Определение проводят методом, указанным для *силикагеля G Р.*

рН (2.2.3). От 7 до 8. Измеряют рН суспензии, полученной встряхиванием 1 г с 10 мл *воды, свободной от углерода диоксида, Р* в течение 5 мин.

Хроматографическая разделяющая способность. Определение проводят методом тонкослойной хроматографии *(2.2.27).* Пластинки готовят, используя взвесь кизельгура G с раствором 2,7 г/л *натрия ацетата Р.* На линию старта хроматографической пластинки наносят 5 мкл раствора, содержащего по 0,1 г/л лактозы, сахарозы, глюкозы и фруктозы в *пиридине Р.* Хроматографируют в системе растворителей *вода Р— 2-пропанол Р — этилацетат Р* (12:23:65). Время прохождения фронта растворителей на расстояние 14 см около 40 мин. Пластинку сушат на воздухе, опрыскивают *раствором анисового альдегида Р,* расходуя около 10 мл и нагревают при температуре от 100°С до 105°С в течение 5 мин. На хроматограмме должны обнаруживаться четыре чётких, хорошо разделённых без «хвостов», пятна.

Кизельгур для хроматографии. 1047500.

Легкий порошок белого или желтовато-белого цвета. Практически нерастворим в воде, разведенных кислотах и органических растворителях.

Скорость фильтрации. Используют хроматографическую колонку размером 0,25 м х 10 мм с пластинкой из пористого стекла (100) и двумя отметками на высоте 0,10 м и 0,20 м над пластинкой. Колонку заполняют испытуемым веществом до первой отметки, а до второй отметки заполняют *водой Р.* Когда первые капли начинают вытекать из колонки, снова заполняют до второй отметки *водой Р* и измеряют время вытекания из колонки первых 5 мл воды. Скорость потока должна быть не менее 1 мл/мин.

Цветность (2.2.2, метод I). Элюат, полученный при испытании на скорость фильтрации, должен быть бесцветным.

Кислотность или щелочность. К 1,00 г прибавляют 10 мл *воды Р,* энергично взбалтывают и выдерживают в течении 5 мин. Суспензию фильтруют через фильтр, предварительно промытый горячей водой Р до нейтральной реакции в промывной воде. К 2,0 мл фильтрата прибавляют 0,05 мл раствора метилового красного Р; раствор должен иметь жёлтое окрашивание. К 2,0 мл фильтрата прибавляют 0,05 мл раствора фенолфталеина Р1; допускается слабо розовое окрашивание раствора.

Водорастворимые вещества. 10,0 г помещают в хроматографическую колонку размером 0,25 м х 10 мм, элюируют *водой Р,* собирая первые 20 мл элюата, выпаривают досуха, остаток сушат при температуре от 100°С до 105°С. Масса остатка должна быть не более 10 мг.

Железо (2.4.9). Не более 0,02% (200 ppm). К 0,50 г прибавляют 10 мл смеси равных объемов *кислоты хлористоводородной Р1* и *воды Р,* энергично встряхивают, выдерживают в течение 5 мин и фильтруют. 1,0 мл фильтрата должен выдерживать испытание на железо.

Потеря в массе после прокаливания. Не более 0,5%. Во время прокаливания (600°С) вещество не должно иметь коричневую или чёрную окраску.

Кислород. O_2. *(М.м.* 32,00). *1108800.*

Содержит не менее 99,99*% (об/об)* O_2.

Азот и аргон: не более 100 ppm.

Углерода диоксид: не более 10 ppm.

Углерода монооксид: не более 5 ppm.

Кислотный синий 1. См. *Сульфановый синий.*

Кислотный синий 83. $C_{45}H_{44}N_3NaO_7S_2$. *(М.м.* 826). *1012200.* [6104-59-2]. Цветной индекс №42660. Бриллиантовый синий Р. Кумасси бриллиантовый синий Р 250.

Порошок коричневого цвета. Нерастворим в холодной воде, мало растворим в кипящей воде и этаноле, растворим в кислоте серной, кислоте уксусной ледяной и разведенных растворах гидроксидов щелочных металлов.

Кислотный синий 90. $C_{47}H_{48}N_3NaO_7S_2$. *(М.м.* 854). *1001300.* [6104-58-1]. Цветной индекс №42655. Натрий [4-[[4-[(4-этоксифенил)амино]фенил][[4-(этил)(3-сульфонатобензил)амино] фенил] метилен]циклогекса-2,5-диен-1-или-ден](этил)-(3-сульфонато-бензил)аммоний.

Порошок тёмно-коричневого цвета с фиолетовым блеском и с вкрапленными частицами, имеющими металлический блеск. Растворим в воде и этаноле.

Потеря в массе при высушивании (2.2.32). Не более 5,0%. 0,500 г сушат в сушильном шкафу при температуре от 100°С до 105°С.

$A_{1см}^{1\%}$: более 500, в пересчёте на сухое вещество. Определение проводят при длине волны 577 нм, используя раствор 0,01 г/л в буферном растворе pH 7,0.

Кислотный синий 92. $C_{26}H_{16}N_3Na_3O_{10}S_3$. *(М.м.* 696). *1001400.* [3861-73-2]. Цветной индекс №13390. Кумасси синий. Аназолен-натрий. Тринатрия 8-гидрокси-4'-(фениламино)азонафталин-3,5',6-трисульфонат.

Кристаллы тёмно-синего цвета. Мало растворим в 96% спирте, растворим в воде, в ацетоне и моноэтиловом эфире этиленгликоля.

Кислотного синего 92 раствор. *1001401.*

0,5 г *кислотного синего 92 Р* растворяют в смеси 10 мл *кислоты уксусной ледяной Р,* 45 мл *96% спирта Р* и 45 мл *воды Р.*

Кислотный хром черный специальный. См. *Протравной черный 11.*

Клобетазола пропионат. $C_{25}H_{32}ClFO_5$. *(М.м.* 467,0). *1097700.* [25122-46-7]. 21-Хлор-9-фтор-11(β,17-дигидрокси-16β-метилпрегна-1,4-диен-3,20-дион-17-пропионат.

Кристаллический порошок белого цвета. Не растворим в воде, растворим в 96% спирте и ацетоне.

$[\alpha]_D^{20}$: около +104°. Определение проводят в диоксане.

Температура плавления: около 196°С.

Кобальта нитрат. $Co(N0_3)_2 \cdot 6H_20$. *(М.м.* 291,0). *1021700.* [10026-22-9].

Мелкие кристаллы гранатового цвета. Очень легко растворим в воде.

Кобальта хлорид. $CoCl_2 \cdot 6H_2O$. *(М.м.* 237,9). *1021600.* [7791-13-1].

Кристаллический порошок красного цвета или кристаллы тёмно-красного цвета. Очень легко растворим в воде, растворим в 96% спирте.

Кодеин. $C_{18}H_{21}NO_3 \cdot H_2O$. *(М.м.* 317,4). *1021800.* [6059-47-8].

4,5α -эпокси-3-метокси-17-метил-7,8-дидегидроморфинан-6-ол.

Кристаллический порошок белого цвета или бесцветные кристаллы. Растворим в кипящей воде, легко растворим в 96% спирте, растворим в эфире.

Содержит не менее 99,0% и не более 101,0% $C_{18}H_{21}NO_3$ в пересчете на сухое вещество.

Потеря в массе при высушивании (2.2.32). От 5,0% до 6,0%. 1,00 г субстанции сушат при температуре от 100°С до 105°С.

Хранят в защищенном от света месте.

Кодеина фосфат. $C_{18}H_{24}NO_7P \cdot 1/2H_2O$. *(М.м.* 406,4). *1021900.* [52-28-8].

4,5α -эпокси-3-метокси-17-метил-7,8-дидегидроморфинан-6α -ол фосфат. Кодеина фосфат гемигидрат.

Белый кристаллический порошок или мелкие бесцветные кристаллы. Легко растворим в воде, мало растворим в 96% спирте, практически нерастворим в эфире.

Содержит не менее 98,5% и не более 101,0% $C_{18}H_{24}NO_7P$ в пересчете на сухое вещество.

Хранят в защищенном от света месте.

Конго красный. $C_{32}H_{22}N_6Na_2O_6S_2$. *(М.м.* 697). *1022000.* [573-58-0). Показатель Шульца №360. Цветной индекс №22120.

Динатрий (бифенил-4,4'-диил-бис-2,2'-азо)бис(1-аминонафталин-4-сульфонат).

Порошок коричневато-красного цвета. Растворим в воде.

Конго красного бумага. *1022002.*

Полоски фильтровальной бумаги погружают на несколько минут в *раствор конго красного Р.* Высушивают.

Конго красного раствор. *1022001.*

0,1 г *конго красного Р* растворяют в смеси 20 мл *96% спирта Р и воды* Р и доводят объём раствора *водой Р* до 100 мл.

Испытание на чувствительность. К 100 мл *воды, свободной от углерода диоксида, Р* прибавляют 0,2 мл раствора конго красного и 0,3 мл *0,1М раствора натрия гидроксида;* появляется синее окрашивание, которое переходит в розовое при прибавлении не более 0,3 мл *0,1М раствора натрия гидроксида.*

Изменение окраски. От синей до розовой в интервале pH 3,0-5,0.

Коричный альдегид. C_9H_8O. *(М.м.* 132,1). *1020700.* [104-55-2]. 3-Фенилпропеналь.

Маслянистая жидкость от желтоватого до зеленовато-жёлтого цвета. Мало растворим в воде, очень легко растворим в 96% спирте и эфире.

d_{20}^{20}: от 1,048 до 1,051.

n_D^{20}: около 1,620.

Хранят в прохладном, защищённом от света месте.

Кортизона ацетат. $C_{23}H_{30}O_6$. *(М.м.* 402,5). *1097800.* [50-04-4]. 17-гидрокси-3,11,20-триоксопрегн-4-ен-21-ил ацетат.

Содержит не менее 97,0% и не более 103,0% $C_{23}H_{30}O_6$ в пересчете на сухое вещество.

Белый или почти белый кристаллический порошок. Практически нерастворим в воде, легко растворим в метиленхлориде, растворим в диоксане, умеренно растворим в ацетоне, мало растворим в 96% спирте и метаноле. Проявляет полиморфизм.

Хранят в защищенном от света месте.

Кофеин. $C_8H_{10}N_4O_2$. *(М.м.* 194,2). *1014400.* [58-08-2].

1,3,7-дигидро-1*H*-пурин-2,6-дион.

Содержит не менее 98,5% и не более 101,5% $C_8H_{10}N_4O_2$ в пересчете на сухое вещество.

Кристаллический порошок или шелковистые кристаллы белого цвета. Легко сублимируется. Умеренно растворим в воде, легко растворим в кипящей воде, мало растворим в этаноле и эфире.

Потеря в массе при высушивании (2.2.32). Не более 0,5%. 1,000г субстанции сушат при температуре от 100°С до 105°С в течение 1 ч.

Хранят в сухом, защищенном от света месте.

Кофейная кислота. $C_9H_8O_4$. *(М.м.* 180,2). *1014300.* [331-39-5].

(E)-3-(3,4-Дигидроксифенил)пропионовая кислота.

Кристаллы или пластинки белого или почти белого цвета. Легко растворима в горячей воде и 96% спирте, умеренно растворима в холодной воде.

Температура плавления: около 225°С с разложением.

Свежеприготовленный раствор с pH 7,6 имеет два максимума поглощения *(2.2.25)* при длинах волн 293 нм и 329 нм.

Красная кровяная соль. См. *Калия феррицианид.*

Крахмал растворимый. *1085100.* [9005-84-9].

Порошок белого цвета.

Готовят раствор 20 г/л в горячей *воде Р.* Раствор должен иметь слабую опалесценцию и оставаться жидким при охлаждении.

Крахмала раствор. *1085103.*

1,0 г *крахмала растворимого Р* растирают в порошок с 5 мл *воды Р,* полученную смесь медленно при постоянном перемешивании вливают в 100 мл кипящей *воды Р,* содержащей 10 *мг ртути (II) йодида Р.*

При использовании реактива каждый раз проводят испытание на чувствительность.

Испытание на чувствительность. Смесь, состоящая из 1 мл раствора крахмала, 20 мл *воды Р,* около 50 мг *калия йодида Р* и 0,05 мл *раствора йода Р1,* должна иметь синее окрашивание.

Крахмала раствор Р1. *1085105.*

1 г *крахмала растворимого* Р смешивают с небольшим количеством холодной *воды Р.* Полученную смесь прибавляют к 200 мл кипящей *воды Р,* прибавляют 250 мг *кислоты салициловой Р,* кипятят в течение 3 мин и немедленно охлаждают.

Срок годности от 2 до 3 недель при хранении раствора при температуре от 4°С до 10°С.

Свежий раствор крахмала готовят в том случае, когда в точке эквивалентности переход окраски от синей к бесцветной не резкий.

Испытание на чувствительность. К 2мл раствора крахмала Р1 прибавляют 20 мл *воды Р,* около 50 *мг калия йодида Р* и 0,05 *мл раствора йода Р1;* полученный раствор должен иметь синее окрашивание.

Крахмала раствор, свободный от йодидов. *1085104.*

Готовят раствор как указано для *раствора крахмала Р,* но без ртути (II) йодида. Готовят непосредственно перед использованием.

Крахмала раствор с калия йодидом. *1070501.*

0,75 г *калия йодида Р* растворяют в 100 мл *воды Р,* нагревают до кипения и прибавляют при перемешивании раствор 0,5 г *крахмала растворимого* Р в 35 мл *воды Р.* Кипятят в течение 2 мин и охлаждают.

Испытание на чувствительность. Смесь, состоящая из 15 мл раствора крахмала с калия йодидом, 0,05 мл *кислоты уксусной ледяной Р* и 0,3 мл *раствора йода Р2,* должна иметь синее окрашивание.

Крезол. C_7H_80. *(М.м.* 108,1). *1022700.* [95-48-7]. о-Крезол. 2-Метилфенол. 4-Окситолуол.

Кристаллы или переохлажденная жидкость, темнеющая на свету и воздухе. Смешивается с этанолом и эфиром, растворим примерно в 50 частях воды и растворах гидроксидов щелочных металлов.

d_{20}^{20}: около 1,05.

n_D^{20}: от 1,540 до 1,550.

Температура кипения: около 190°С.

Температура затвердевания (2.2.18). Не ниже 30,5°С.

Остаток после выпаривания. Не более 0,1*% (м/м).* Выпаривают на водяной бане и сушат при температуре от 100°С до 105°С.

Хранят в защищённом от кислорода, света и влаги месте, перед использованием перегоняют.

Крезоловый красный. $C_{21}H_{18}O_5S$. *(М.м.* 382,4). *1022800.* [1733-12-6]. Крезолсульфонфталеин. 4,4'-(3Н-2,1-Бензоксатиол-3-илиден)бис(2-метилфенол)S,S-диоксид.

Кристаллический порошок красновато-коричневого цвета. Мало растворим в воде, растворим в 96% спирте и разведенных растворах гидроксидов щелочных металлов.

Крезолового красного раствор. *1022801.*

0,1 г *крезолового красного* Р растворяют в смеси 2,65 мл *0,1 М раствора натрия гидроксида* и 20 мл *96% спирта Р,* доводят объём раствора *водой* Р до 100 мл.

Испытание на чувствительность. К 100 мл *воды, свободной от углерода диоксида, Р* прибавляют 0,1 мл раствора крезолового красного и 0,15 мл *0,02 М раствора натрия гидроксида;* появляется пурпурно-красное окрашивание, которое должно перейти в жёлтое при прибавлении не более 0,15 мл *0,02 М раствора кислоты хлористоводородной.*

Изменение окраски. От жёлтой до красной в интервале рН 7,0-8,6.

м-Крезоловый пурпуровый. $C_{2l}H_{18}O_5S$. *(М.м.* 382,44). *1121700.* [2303-01-7].

m-Крезолсульфонфталеин.

Кристаллический порошок оливково-зелёного цвета. Мало растворим в воде, растворим в 96% спирте, кислоте уксусной ледяной и метаноле.

м-Крезолового пурпурового раствор. *1121701.*

0,1 г *м-крезолового пурпурового Р* растворяют в 13 мл *0,01 М раствора натрия гидроксида,* доводят объём раствора *водой* Р до 100 мл и перемешивают.

Изменение окраски. От красной до жёлтой в интервале pH 1,2-2,8.

От жёлтой до фиолетовой в интервале pH 7,4-9,0.

Кремневольфрамовая кислота. $H_4SiW_{12}O_{40}{\cdot}H_2O$. *1078000.* [11130-20-4].

Кристаллы белого или желтовато-белого цвета, расплываюшиеся на воздухе. Очень легко растворима в воде и 96% спирте.

Хранят в воздухонепроницаемом контейнере.

Кристаллический фиолетовый. $C_{25}H_{30}ClN_3$. *(М.м.* 408,0). *1022900.* [548-62-9]. Показатель Шульца №78. Цветной индекс №42555. Гексаметилпарарозанилина хлорид.

Кристаллы или порошок темно-зелёного цвета. Растворим в воде и 96% спирте.

Кристаллического фиолетового раствор. *1022901.*

0,5 г *кристаллического фиолетового Р* растворяют в *кислоте уксусной безводной Р* и доводят объем раствора тем же растворителем до 100мл.

Испытание на чувствительность. К 50 мл *кислоты уксусной безводной Р* прибавляют 0,1 мл раствора кристаллического фиолетового; появляется голубовато-фиолетовое окрашивание, которое переходит в голубовато-зелёное при прибавлении 0,1 мл *0,1 М раствора кислоты хлорной.*

Ксантгидрол. $C_{13}H_{10}O_2$. *(М.м.* 198,2). *1096100.* [90-46-0]. 9-Ксантенол. 9-Оксиксантен.

Содержит не менее 90,0% $C_{13}H_{10}O_2$.

Порошок или мелкие игольчатые кристаллы от белого до светло-жёлтого цвета. Очень мало растворим в воде, растворим в 96% спирте, эфире и кислоте уксусной ледяной.

Доступен также в виде раствора, содержащего от 90 г/л до 110 г/л ксантгидрола *в метаноле Р.*

Температура плавления: около 123°С.

Количественное определение. 0,300 г ксантгидрола помещают в колбу вместимостью 250 мл, растворяют в 3 мл *метанола Р* или используют 3,0 мл раствора. Прибавляют 50 мл *кислоты уксусной ледяной* Р и по каплям при встряхивании 25 мл раствора 20 г/л *мочевины Р.* Отстаивают 12 ч, затем фильтруют через стеклянный фильтр (16). Осадок на фильтре промывают 20 мл *96% спирта Р,* сушат в сушильном шкафу при температуре от 100°С до 105°С и взвешивают.

1 г осадка соответствует 0,9429 г ксантгидрола.

Хранят в защищённом от света месте. Если используют метанольный раствор, то хранят в небольших герметично закрытых ампулах и при необходимости перед использованием фильтруют.

Ксантгидрол Р1 *1096101.*

Содержит не менее 98,0% $C_{13}H_{10}O_2$.

Должен выдерживать требования для *ксантгидрола Р* и следующее дополнительное требование.

Ксантгидрола раствор. *1096102.*

К 100 мл *кислоты уксусной безводной Р* прибавляют 0,1 мл раствора 100 г/л *ксантгидрола Р и метаноле Р,* 1 мл *кислоты хлористоводородной Р* и выдерживают 24 ч.

Ксангидроловый реактив. 10 мг *ксангидрола Р* растворяют в 100 мл *кислоты уксусной ледяной Р* и прибавляют 1 мл *кислоты хлористоводородной Р*. Реактив применяют свежеприготовленным.

Ксиленоловый оранжевый. $C_{31}H_{28}N_2Na_4O_{13}S$. *(М.м.* 761). *1096300.* [3618-43-7].
Тетранатрий 3,3'-(3Н-2,1-бензоксати-ол-3-илиден)бис[(6-гидрокси-5-метил-3,1-фенилен)метилениминобисацетат]S,S-диоксид.

Кристаллический порошок красновато-коричневатого цвета. Растворим в воде.

Ксиленолового оранжевого индикаторная смесь. *1096301.*

Растирают в порошок 1 часть *ксиленолового оранжевого Р с 99* частями *калия нитрата Р.*
Испытание на чувствительность. К 50 мл *воды Р* прибавляют 1 мл *кислоты уксусной разведенной Р,* 50 мг индикаторной смеси ксиленолового оранжевого и 0.05 мл *раствора свинца (II) нитрата Р.* Прибавляют *гексаметилентетрамин Р* до тех пор, пока окраска раствора не изменится от жёлтой до фиолетово-красной; после прибавления 0,1 мл *0,1 М раствора натрия эдетата* окраска раствора должна измениться на жёлтую.

Ксилоза. $C_5H_{10}O_5$. *(М.м.* 150,1). *1096400.* [58-86-6]. D-ксилоза.

Кристаллический порошок белого цвета или бесцветные игольчатые кристаллы. Очень легко растворима в воде, растворима в горячем 96% спирте.

$[\alpha]_D^{20}$: около +20°. Определение проводят, используя раствор 100 г/л через 10 ч после его приготовления.

Ксилол. C_8H_{10}. *(М.м.* 106,2). *1096200.* [1330-20-7]. Диметилбензол.

Смесь изомеров. Прозрачная, бесцветная, воспламеняющаяся жидкость. Практически не растворим в воде, смешивается с 96% спиртом и эфиром.

d_{20}^{20}: около 0,867.

n_D^{20}: около 1,497.

Температура кипения: около 138°С.

о-Ксилол. C_8H_{10}. *(М.м.* 106,2). *1100600.* [95-47-6]. 1,2-Диметилбензол.

Прозрачная, бесцветная, воспламеняющаяся жидкость. Практически не растворим в воде, смешивается с 96% спиртом и эфиром.

d_{20}^{20}: около 0,881.

n_D^{20}: около 1,505.

Температура кипения: около 144°С.

Температура плавления: около -25°С.

м-Ксилол.C_8H_{10}. *(М.м.* 106.2). *1117700.* [108-38-3]. 1,3 - Диметилбензол.

Прозрачная, бесцветная, воспламеняющаяся жидкость. Практически не растворим в воде, смешивается с 96% спиртом и эфиром.

d_{20}^{20}: около 0,884.

n_D^{20}: около 1,497.

Температура кипения: около 139°С.

Температура плавления: около -47°C.

Кукурузное масло. *1050400.*

Жирное масло, полученное из зародышей *Zea mays L.* выдавливанием или экстракцией.

Прозрачная жидкость от светло-жёлтого до золотисто-жёлтого цвета. Практически нерастворимо в 96% спирте, смешивается с эфиром и петролейным эфиром,

Йодное число (2.5.4). От 103 до 128.

Перекисное число (2.5.5). Не более 5.

Число омыления (2.5.6). От 187 до 195.

Идентификация. Определение проводят методом тонкослойной хроматографии *(2.3.2).* Полученная хроматограмма должна совпадать с хроматограммой для кукурузного масла, представленной на Рис. 2.3.2.-1.

Кумасси красящий раствор. *1012201.*

Раствор 1,25 г/л *кислотного синего 83 Р в* смеси растворителей *кислота уксусная ледяная Р -метанол Р - вода* (1:4:5). Фильтруют.

Кумасси синий. *1001400.* [3861-73-2]. См. *Кислотный синий 92.*

Кумасси синего раствор. *1001401.* См. *Кислотного синего 92 раствор.*

Куркумин. $C_{21}H_{20}O_6$. *(М.м.* 368,4). *1023500.* [458-37-7].

1,7-Бис(4-гидрокси-3-метоксифенил)гепта-1,6-диен-3,5-дион.

Кристаллический порошок оранжево-коричневого цвета. Практически нерастворим в воде, растворим в кислоте уксусной ледяной, практически нерастворим в эфире.

Температура плавления: около 183°C.

Лавандолол. $C_{10}H_{18}O$. *(М.м.* 154,2). *1114100.* [6544-40-7].

2-Изопропенил-5-метилгекс-4-ен-1-ол.

Маслянистая жидкость с характерным запахом.

d_{20}^{20}: около 0,875.

n_D^{20}: около 1,407.

$[\alpha]_D^{20}$: около –10,2°.

Температура кипения $_{13}$: около 94°C.

Лавандолол, используемый в газовой хроматографии, должен выдерживать следующее дополнительное испытание.

Количественное определение. Проводят методом газовой хроматографии *(2.2.28)* в условиях, указанных в статье *Масло лавандовое.*

Испытуемый раствор. Испытуемая субстанция.

Площадь основного пика должна быть не менее 98,0% суммы площадей всех пиков.

Лавандолола ацетат. $C_{12}H_{20}O_2$. *(М.м.* 196,3). *1114200.* [50373-59-6].
2-Изопропенил-5-метилгекс-4-ен-1 -ил ацетат.

Бесцветная жидкость с характерным запахом.

d_{20}^{20}: около 0,911.

n_D^{20}: около 1,454.

Температура кипения$_{13}$: от 106°С до 107°С.

Лавандолола ацетат, используемый в газовой хроматографии, должен выдерживать следующее дополнительное испытание.

Количественное определение. Проводят методом газовой хроматографии *(2.2.28)* в условиях, указанных в статье *Масло лавандовое.*

Испытуемый раствор. Испытуемая субстанция:

Площадь основного пика должна быть не менее 93,0% суммы площадей всех пиков.

Лакмус. *1049300.* [1393-92-6]. Показатель Шульца № 1386.

Фрагменты сине-фиолетового цвета, полученные из различных видов *Rocella, Lecanora* или других лишайников. Растворим в воде, практически не растворим в 96% спирте.

Изменение окраски. От красной до синей в интервале рН 5-8.

Лакмусовая бумага синяя. *1049301.*

10 частей грубо измельченного *лакмуса Р* кипятят со 100 частями *96% спирта Р* в течение 1 ч. Спирт декантируют, к остатку прибавляют смесь из 45 частей *96% спирта* Р и 55 частей *воды Р.* Через 2 дня прозрачную жидкость декантируют, пропитывают полоски фильтровальной бумаги и сушат.

Испытание на чувствительность. Полоску фильтровальной бумаги размером 10 х 60 мм погружают в смесь 10 мл *0,02 М раствора кислоты хлористоводородной* и 90 мл *воды Р.* При встряхивании бумага должна приобрести красное окрашивание в течение 45 с.

Лакмусовая бумага красная. *1049302.*

К синему экстракту лакмуса прибавляют по каплям *кислоту хлористоводродную разведенную Р* до перехода синей окраски в красную. Полоски фильтровальной бумаги пропитывают полученным раствором и сушат.

Испытание на чувствительность. Полоску фильтровальной бумаги размером 10 х 60 мм погружают в смесь 10 мл *0,02 М раствора* натрия гидроксида и 90 мл *воды Р*. При встряхивании бумага должна приобрести синее окрашивание в течение 45 с.

Лактобионовая кислота. $C_{12}H_{22}O_{12}$. *(М.м.* 358,3). *1101600.* [96-82-2].

Кристаллический порошок белого цвета. Легко растворима в воде, практически нерастворима в 96% спирте.

Температура плавления: около 115°С.

Лактоза. $C_{12}H_{22}O_{11}\cdot H_2O$. *(М.м.* 360,3). *1047900.* [5989-81-1].

О- b -D-галактопиранозил-(1→4)- a -D-глюкопираноза. Лактоза моногидрат.

Белый или почти белый кристаллический порошок. Легко, но медленно растворим в воде, практически нерастворим в 96% спирте. Может содержать в различных пропорциях аморфную лактозу.

$[a]_D^{20}$: от +54,4^o до +55,9^o. 10,0 г безводной субстанции растворяют в 80 мл *воды Р* при нагревании до 50^{o}С, охлаждают, прибавляют 0,2 мл *разведенного аммиака Р1*, оставляют на 30 мин и затем доводят *водой Р* до объема 100,0 мл.

Вода (2.5.12). От 4,5% до 5,5% (полумикрометод) с использованием в качестве растворителя смеси *формамид Р* и *метанол Р* 1:2.

Хранят в воздухонепроницаемом контейнере.

Лантана (III) нитрат. $La(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$. *(М.м.* 433,0). *1048000.* [10277-43-7].

Лантана тринитрат гексагидрат.

Бесцветные кристаллы, расплывающиеся на воздухе. Легко растворим в воде.

Хранят в воздухонепроницаемом контейнере.

Лантана (III) нитрата раствор. *1048001.*

Раствор 50 г/л.

Лантана (III) оксид. La_2O_3. *(М.м.* 325,8). *1114000.* [1312-81-8]. Лантана триоксид.

Аморфный порошок почти белого цвета. Практически нерастворим в воде, растворим в разведенных минеральных кислотах, поглощает углерода диоксид из воздуха.

Кальций. Не более 5 ppm.

Лантана (III) хлорида раствор. *1114001.*

К 58,65 г *лантана (III) оксида Р* медленно прибавляют 100 мл *кислоты хлористоводородной Р,* нагревают до кипения, охлаждают и доводят объём раствора *водой Р до* 1000.0 мл.

Лауриловый спирт. $C_{12}H_{26}O$. *(М.м.* 186,3). *1119900.* 1-Додеканол.

d_{20}^{20}: около 0,820.

Температура кипения: от 24°С до 27°С.

Левоментол. $C_{10}H_{22}O$. *(М.м.* 156,3). *1051600.* [2216-51-5]. (1R,2S,5R)-5-метил-2-(1-метилэтил)циклогексанол.

Кристаллы призматические или игольчатые, бесцветные, блестящие. Практически нерастворим в воде, очень легко растворим в 96% спирте, эфире, петролейном эфире, легко растворим в жирных маслях и вазелиновом масле, очень мало растворим в глицерине. Плавится при температуре около 43°С.

$[\alpha]_D^{20}$: от –48° до –51°. Определение проводят используя раствор 100 г/л субстанции в *96% спирте Р*.

Хранят в прохладном месте.

Лейцин. $C_6H_{13}NO_2$. *(М.м.* 131,6). *1048500.* [61-90-5]. (S)-2-амино-4-метилпентановая кислота.

Содержит не менее 98,5% и не более 101,0% $C_6H_{13}NO_2$ в пересчете на сухое вещество.

Блестящие пластинки или кристаллический порошок белого или почти белого цвета. Умеренно растворим в воде, практически нерастворим в 96% спирте и эфире.

$[\alpha]_D^{20}$: от +14,5°.до +16,5°, в пересчете на сухое вещество. 1,000 г субстанции растворяют в *кислоте хлористоводородной Р1* и доводят объем раствора той же кислотой до 25,0 мл.

Потеря в массе при высушивании (2.2.32). Не более 0,5%. 1,000 г субстанции сушат при температуре от 100°С до 105°С.

Лимонен. $C_{10}H_{16}$. *(М.м.* 136,2). *1048600.* [5989-27-5]. D-Лимонен.

(+)-n-Мента-1,8-диен. (R)-4-Изопропенил-1 -метилциклогекс-1 -ен.

Бесцветная жидкость. Практически не растворим в воде, растворим в 96% спирте.

d_{20}^{20}: около 0,84.

n_D^{20}: от 1,471 до 1,474.

$[a]_D^{20}$: от+96° до+106°.

Температура кипения: от 175°С до 177°С.

Лимонен, используемый в газовой хроматографии, должен выдерживать следующее дополнительное испытание.

Количественное определение. Проводят методом газовой хроматографии *(2.2.28),* как указано в статье *Масло мяты перечной,* используя лимонен в качестве испытуемого раствора.

Площадь основного пика должна быть не менее 99,0% суммы площадей всех пиков.

Лимонная кислота. $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$. *(М.м.* 210,1). *1021000.* [5949-29-1].

2-Гидроксипропан-1,2,3-трикарбоновая кислота. Кислота лимонная моногидрат.

Содержит не менее 99,5% и не более 100,5% $C_6H_8O_7$ в пересчете на безводное вещество.

Кристаллический порошок белого цвета или бесцветные кристаллы или гранулы. Выветриваются на воздухе. Очень легко растворима в воде, легко растворима в 96% спирте.

Вода (2.5.12). От 7,5% до 9,0%. Определение проводят из 0,500 г субстанции полумикрометодом.

При использовании в испытании на железо кислота лимонная должна выдерживать следующее дополнительное испытание.

0,5 г кислоты лимонной растворяют в 10 мл *воды Р,* прибавляют 0,1 мл *кислоты тиогликолевой Р,* перемешивают, прибавляют *раствор аммиака Р* до щелочной реакции и доводят объём полученного раствора *водой* Р до 20 мл. Раствор не должен окрашиваться в розовый цвет.

Хранят в плотно укупоренном контейнере.

Лимонная кислота безводная. $C_6H_8O_7$. *(М.м.* 192,1). *1021200.* [77-92-9].

2-Гидроксипропан-1,2,3-трикарбоновая кислота. Кислота лимонная безводная.

Содержит не менее 99,5% и не более 101,0% $C_6H_8O_7$ в пересчете на безводное вещество.

Кристаллический порошок белого цвета или бесцветные кристаллы или гранулы. Очень легко растворима в воде, легко растворима в 96% спирте, умеренно растворима в эфире.

Вода (2.5.12). Не более 1,0%. Определение проводят из 2,000 г субстанции полумикрометодом.

Хранят в плотно укупоренном контейнере.

Лимонное масло. *1101700.*

Лимонное масло – эфирное масло, полученное соответствующим механическим методом без нагревания из свежей кожуры Citrus Limon (L).

Содержит не менее 2,2% (*м/м*) и не более 4,5% (*м/м*) карбонильных компонентов в пересчете на цитраль ($C_{10}H_{16}O$, *М.м.* 152,2).

Прозрачная подвижная от бежево-желтой до зеленовато-желтой жидкость. Мутнеет при низкой температуре. Смшивается с этанолом, эфиром и кислотой уксусной ледяной.

d_{20}^{20}: от 0,850 до 0,858.

n_D^{20}: от 1,474 до 1,476.

Оптическое вращение (2.2.7): от+57° до+70°.

Хранят в заполненном доверху, герметично укупоренном контейнере, в защищенном от света месте.

Линалила ацетат. $C_{12}H_{20}O_2$. *(М.м.* 196,3). *1107200.* [115-95-7].

(RS)-1,5-Диметил-1-винилгекс-4-енил ацетат.

Бесцветная или слегка желтая жидкость с сильным запахом бергамота и лаванды.

d_{25}^{25}: от 0,895 до 0,912.

n_D^{20}: от 1,448 до 1,451.

Температура кипения: около 215°C.

Линалила ацетат, используемый в газовой хроматографии, должен выдерживать следующее дополнительное испытание.

Количественное определение. Проводят методом газовой хроматографии *(2.2.28),* как указано в статье *Масло цветков померанца,* используя линалила ацетат в качестве испытуемого раствора.

Площадь основного пика должна быть не менее 95,0% суммы площадей всех пиков.

Линалол. $C_{10}H_{18}O$. *(М.м.* 154,2). *1048700.* [78-70-6].
(RS)-3,7-Диметилокта-1,6-диен-3-ол.

Смесь двух стереоизомеров (ликареола и кориандрола).

Жидкость. Практически нерастворим в воде, растворим в эфире.

d_{20}^{20}: около 0,860.

n_D^{20}: около 1,462.

Температура кипения: около 200°C.

Линалол, используемый в газовой хроматографии, должен выдерживать следующее дополнительное испытание.

Количественное определение. Проводят методом газовой хроматографии *(2.2.28),* как указано в статье *Масло анисовое,* используя линалол в качестве испытуемого раствора.

Площадь основного пика должна быть не менее 98,0% суммы площадей всех пиков.

Литий. Li. *(А.м.* 6,94). *1048800.* [7439-93-2].

Мягкий металл, на свежем срезе серебристо-серого цвета, при контакте с воздухом быстро становится тусклым. Бурно реагирует с водой с образованием водорода и раствора лития гидроксида; растворим в метаноле с образованием водорода и раствора лития метоксида; практически нерастворим в эфире и петролейном эфире.

Хранят под петролейным эфиром или жидким парафином.

Лития гидроксид. $LiOH \cdot H_2O$. *(М.м.* 41,96). *1049100.* [1310-66-3]. Лития гидроксид моногидрат.

Гранулированный порошок белого цвета. Является сильной щелочью, быстро поглощает воду и углерода диоксид, растворим в воде, умеренно растворим в 96% спирте.

Хранят в воздухонепроницаемом контейнере.

Лития карбонат. Li_2CO_3. *(М.м.*73,9*). 1048900.* [554-13-2]. Дилития карбонат.

Легкий порошок белого цвета. Умеренно растворим в воде, очень мало растворим в 96% спирте. Насыщенный раствор при температуре 20°С содержит около 13 г/л Li_2CO_3.

Лития метаборат безводный. $LiBO_2$. *(М.м.* 49,75). *1120000.* [13453-69-5].

Лития сульфат. $Li_2SO_4 \cdot H_2O$. *(М.м.* 128,0). *1049200.* [10102-25-7]. Дилития сульфат моногидрат.

Бесцветные кристаллы. Легко растворим в воде, практически не растворим в 96% спирте.

Лития хлорид. LiCl. *(М.м.* 42,39). *1049000.* [7447-41-8].

Кристаллический порошок или гранулы, или кубические кристаллы; расплывается на воздухе. Легко растворим в воде, растворим в ацетоне и 96% спирте. Водные растворы имеют нейтральную или слабо щелочную реакцию.

Хранят в воздухонепроницаемом контейнере.

Люголя раствор. 0,5 г *йода Р* и 1 г *калия йодида Р* растворяютт в небольшом количестве *воды Р* и разбавляют этим же растворителем до 100 мл. Перед употреблением раствор разбавляют *водой Р* в соотношении 1:4. Хранят в защищенном от света месте.

Люмифлавин. $C_{13}H_{12}N_4O_2$. *(М.м.* 256,3). *1141000.* [1088-56-8].

7,8.10-Триметилбензо[g]птеридин-2,4 (3H, 10*H*)-дион.

Порошок желтого цвета или кристаллы оранжевого цвета. Очень мало растворим в воде, легко растворим в метиленхлориде.

Магний. Mg. *(А.м.* 24,30). *1049500.* [7439-95-4].

Лента, или стружка, или проволока серебристо-белого цвета, или порошок серого цвета.

Магния ацетат. $C_4H_6MgO_4 \cdot 4H_2O$ *(М.м.* 214,5). *1049600.* [16674-78-5]. Магния диацетат тетрагидрат.

Бесцветные кристаллы, расплывающиеся на воздухе. Легко растворим в воде и 96% спирте.

Хранят в воздухонепроницаемом контейнере.

Магния нитрат. $Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$. *(М.м.* 256,4). *1049800.* [13446-18-9]. Магния нитрат гексагидрат.

Бесцветные прозрачные кристаллы, расплывающиеся на воздухе. Очень легко растворим в воде, легко растворим 96% спирте.

Хранят в воздухонепроницаемом контейнере.

Магния нитрата раствор. *1049801.*

17,3 г *магния нитрата Р* растворяют при осторожном нагревании в 5 мл *воды Р,* прибавляют 80 мл *96% спирта Р,* охлаждают и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл.

Магния оксид. MgO. *(М.м.* 40,30). *1049900.* [1309-48-4]. Магния оксид лёгкий.

Содержит не менее 98,0% и не более 100,5% MgO в пересчете на прокаленное вещество.

Мелкий аморфный порошок белого цвета. Практически нерастворим в воде, в которой проявляет щелочную реакцию по фенолфталеину. Растворяется в разведенных кислотах, в большинстве случаев со слабым выделением пузырьков газа.

Насыпной объем: 15 г субстанции занимает объем около 150 мл.

Хранят в плотно укупоренным контейнере.

Магния оксид Р1. *1049901.*

Должен выдерживать требования для *магния оксида Р со* следующими изменениями.

Мышьяк (2.4.2, метод А). Не более 0,0002% (2 ppm). 0,5 г магния оксида растворяют в смеси 5 мл *воды Р* и 5 мл *кислоты хлористоводродной Р1* Полученный раствор должен выдерживать испытание на мышьяк.
Тяжёлые металлы (2.4.8, метод А). Не более 0,001% (10 ppm). 0,75 г магния оксида растворяют в смеси 3 мл *воды Р* и 7 мл *кислоты хлористоводородной Р1,* прибавляют 0,05 мл *раствора фенолфталеина Р* и *раствора аммиака концентрированного Р* до розового окрашивания. Избыток аммиака нейтрализуют *кислотой уксусной ледяной Р,* прибавляют 0,5 мл избытка кислоты, доводят *водой Р* до объёма 15 мл и фильтруют, если необходимо. 12 мл раствора должны выдерживать испытание на тяжёлые металлы. Эталон готовят с использованием 5 мл *эталонного раствора свинца (1 ppm Pb) Р* и 5 мл *воды Р.*

Железо (2.4.9). Не более 0,005% (50 ppm). 0,2 г магния оксида растворяют в 6 мл *кислоты хлористоводродной разведенной Р* и доводят объём раствора *водой* Р до 10 мл. Полученный раствор должен выдерживать испытание на железо.

Магния оксид легкий. См. *Магния оксид.*

Магния оксид тяжелый. MgO. *(М.м.* 40,30). *1050000.* [1309-48-4].

Содержит не менее 98,0% и не более 100,5% MgO в пересчете на прокаленное вещество.

Мелкий порошок белого цвета. Практически нерастворим в воде, в которой проявляет щелочную реакцию по фенолфталеину. Растворяется в разведенных кислотах, в большинстве случаев со слабым выделением пузырьков газа.

Насыпной объем: 15 г субстанции занимает объем около 150 мл.

Хранят в плотно укупоренным контейнере.

Магния сульфат. $MgSO_4 \cdot 7H_2O$. *(М.м.* 246,5). *1050200.* [10034-99-8]. Магния сульфат гептагидрат.

Содержит не менее 99,0% и не более 100,5% $MgSO_4$ в пересчете на сухое вещество.

Кристаллический порошок белого цвета или блестящие бесцветные кристаллы. Легко растворим в воде, очень легко растворим в кипящей воде, практически нерастворим в 96% спирте.

Магния хлорид. $MgCl_2 \cdot 6H_2O$. *(М.м.* 203,3). *1049700.* [7791-18-6]. Магния хлорид гексагидрат.

Содержит не менее 98,0% и не более 101,0% $MgCl_2 \cdot 6H_2O$.

Бесцветные кристаллы. Гигроскопичен. Очень легко растворим в воде, легко растворим в 96% спирте.

Хранят в воздухонепроницаемом контейнере.

Майера реактив. 1,358 г *ртути (II) хлорида Р* растворяют в 60 мл *воды Р*, прибавляют 10 мл раствора 500 г/л *калия йодида Р* и доводят объем раствора *водой Р* до 100,0 мл.

Макрогол 23 лауриловый эфир.*1129000.*
Номинальное количество этиленоксидных групп связанных с лауриловым спиртом равно 23.
Белая жирная масса, растворимая или диспергируемая в воде, растворимая в 96% спирте, практически нерастворимая в петролейном эфире.
Хранят в плотно укупоренном контейнере.

Макрогол 200. *1099200.* [25322-68-3]. Полиэтиленгликоль 200.

Прозрачная, бесцветная или почти бесцветная, вязкая жидкость. Легко растворим в ацетоне и этаноле, практически нерастворим в эфире и жирных маслах.

d_{20}^{20} : около 1,127.

n_D^{20} : около 1,450.

Макрогол 200 Р1. *1099201.*

500 мл *макрогола 200 Р* помещают в круглодонную колбу вместимостью 1000 мл, отгоняют летучие вещества при температуре 60°С в течение 6 ч, используя ротационный испаритель и вакуум от 1,5 кПа до 2,5 кПа.

Макрогол 300. *1067100.* [25322-68-3]. Полиэтиленгликоль 300. См. статью *Макроголы.*

Макрогол 400. *1067200.* [25322-68-3]. Полиэтиленгликоль 400. См. статью *Макроголы.*

Макрогол 1000. *1067300.* [25322-68-3]. Полиэтиленгликоль 1000. См. статью *Макроголы.*
Макрогол 1500.*1067400.* [25322-68-3]. Полиэтиленгликоль 1500. См. статью *Макроголы.*

Макрогол 20 000. *1067600.* Полиэтиленгликоль 20 000. См. статью *Макроголы.*

Макрогол 20 000 2-нитротерефталат. *1067601.*

Полиэтиленгликоль 20 000 2-нитротерефталат.

Макрогол 20 000 Р модифицированный обработкой кислотой 2-нитротерефталевой.

Твёрдая воскообразная масса белого или почти белого цвета. Растворим в ацетоне.

Малахитовый зелёный. $C_{23}H_{25}ClN_2$. *(М.м.* 364,9). *1050500.* [123333-61-9]. Показатель Шульца №754. Цветной индекс №42000. [4-[[4-(Диметиламино)фенил)фенилметилен]-циклогекса-2,5-диен-1-илиден]диметиламмония хлорид.

Кристаллы зелёного цвета с металлическим блеском. Очень легко растворим в воде с образованием раствора синевато-зеленого цвета, растворим в 96% спирте и метаноле.

Раствор 0,01 г/л в *96% спирте Р* имеет максимум поглощения *(2.2.25)* при длине волны 617 нм.

Малахитового зелёного раствор. *1050501.* Раствор 5 г/л в *кислоте уксусной безводной Р.*

Малеиновая кислота. $C_4H_4O_4$. *(М.м.*116,1). *1050600.* [110-16-7]. (*Z*)-бутендионовая кислота.

Содержит не менее 99,0% и не более 101,0% $C_4H_4O_4$ в пересчете на безводное вещество.

Кристаллический порошок белого цвета. Легко растворима в воде и 96% спирте, умеренно растворима в эфире.

Вода (2.5.12). Не более 2%. Определение проводят из 1,00 г субстанции полумикрометодом.

Хранят в стеклянном контейнере, в защищенном от света месте.

Малеиновый ангидрид. $C_4H_2O_3$. *(М.м.* 98,1). *1050700.* [108-31-6]. Бутендионовый ангидрид. 2,5-Фурандион.

Кристаллы белого цвета. Растворим в воде с образованием кислоты малеиновой, очень легко растворим в ацетоне и этилацетате, легко растворим в толуоле, растворим в 96% спирте с образованием сложного эфира, очень мало растворим в петролейном эфире.

Температура плавления: около 52°C.

Любой остаток, нерастворимый в толуоле, не должен превышать 5% (кислота малеиновая).

Малеинового ангидрида раствор. *1050701.*

5 г *малеинового ангидрида Р* растворяют в *толуоле Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 100 мл.

Срок годности 1 мес; раствор фильтруют в случае помутнения.

Маннит. $C_6H_{14}O_6$. *(М.м.* 182.2). 1051000. [69-65-8]. D-Маннитол. Маннитол.

Содержит не менее 98,0% и не более 102,9% D-Маннитола в пересчете на безводное вещество.

Белый или почти белый кристаллический порошок или легкие гранулы. Легко растворим в воде, очень мало растворим в 96% спирте. Проявляет полиморфизм.

Маннитол. См. *Маннит.*

Манноза. $C_6H_{12}O_6$. *(М.м.* 180,2). *1051100.* [3458-28-4]. D-(+)-Манноза.

Кристаллический или мелкокристаллический порошок белого цвета. Очень легко растворима в воде, мало растворима в этаноле.

$[\alpha]_D^{20}$: от +13,7° до +14,7°. Определение проводят, используя раствор 200 г/л в *воде Р,* содержащей около 0,05% NH_3.

Температура плавления: около 132°C с разложением.

L-Манноза. См. *Рамноза.*

Марганца (II) сульфат. $MnSO_4 \cdot H_2O$. *(М.м.* 169,0). *1050900.* [10034-96-5]. Марганца сульфат моногидрат.

Кристаллический порошок или кристаллы бледно-розового цвета. Легко растворим в воде, практически нерастворим в 96% спирте.

Потеря в массе после прокаливания. От 10,0% до 12,0%. Определение проводят из 1,000 г при температуре 500°C.

Масляная кислота. $C_4H_8O_2$. *(М.м.* 88,1). *1014000.* [107-92-6]. Бутановая кислота.

Содержит не менее 99,0% $C_4H_8O_2$.

Маслянистая жидкость. Смешивается с водой, 96% спиртом.

d_{20}^{20}: около 0,96.

n_D^{20}: около 1,398.

Температура кипения: около 163°C.

Меди (II) ацетат. $C_4H_6CuO_4 \cdot H_2O$. *(М.м.* 199,7). *1022200.* [142-71-2].

Кристаллы или порошок голубовато-зелёного цвета. Легко растворим в кипящей воде, растворим в воде и 96% спирте, мало растворим в эфире и глицерине (85%).

Меди (II) нитрат. $Cu(NO_3)_2 \cdot 3H_2O$. *(М.м.* 241,6). *1022400.* [10031-43-3]. Меди динитрат тригидрат.

Кристаллы синего цвета. Гигроскопичен, очень легко растворим в воде, водный раствор имеет сильно кислую реакцию, легко растворим в 96% спирте и кислоте азотной разведенной.

Хранят в воздухонепроницаемом контейнере.

Меди нитрата раствор. Раствор 50 г/л.

Меди (II) сульфат. $CuSO_4 \cdot 5H_2O$. (*М.м*. 249.7). 1022500. [7758-99-8].

Порошок или кристаллы синего цвета. Медленно выветривается на воздухе, очень легко растворим в воде, мало растворим в 96% спирте.

Меди (II) сульфата раствор. *1022501.*

Раствор 125 г/л.

Меди тетрааммиаката аммиачный раствор. *1022600.*

34,5 г *меди (II) сульфата Р* растворяют в 100 мл *воды Р,* прибавляют при перемешивании по каплям *раствор аммиака концентрированный Р* до растворения образовавшегося осадка. Поддерживая температуру ниже 20С°, при непрерывном встряхивании прибавляют по каплям 30 мл *раствора натрия гидроксида концентрированного Р.* Фильтруют через стеклянный фильтр (40), промывают *водой Р* до получения прозрачного фильтрата. Встряхивают с 200 мл *раствора аммиака концентрированного Р* и фильтруют через стеклянный фильтр, затем повторно фильтруют, чтобы уменьшить осадок до минимума.

Меди (II) хлорид. $CuCl_2 \cdot 2H_2O$. *(М.м.* 170,5). *1023000.* [10125-13-0]. Меди хлорид дигидрат.

Порошок или кристаллы зеленовато-голубого цвета, расплывающиеся на воздухе, выветриваются в сухом воздухе. Легко растворим в воде, 96% спирте и метаноле, умеренно растворим в ацетоне, мало растворим в эфире.

Хранят в воздухонепроницаемом контейнере.

Меди эдетата раствор. *1022300.*

К 2 мл раствора 20 г/л *меди (II) ацетата Р* прибавляют 2 мл *0,1 М раствора натрия эдетата* и доводят объём раствора *водой Р* до 50 мл.

Медно-тартратный раствор. *1023300.*

Раствор I. 34,6 г *меди (II) сульфата Р* растворяют в *воде Р,* доводят объём раствора тем же растворителем до 500 мл.

Раствор II. 173 г *калия-натрия тартрата Р* и 50 г *натрия гидроксида Р* растворяют в 400 мл *воды Р.* Нагревают до кипения, охлаждают, доводят объём полученного раствора *водой, свободной от углерода диоксида, Р* до 500 мл.

Непосредственно перед использованием смешивают равные объёмы растворов I и II.

Медно-тартратный раствор Р2. *1023302.*

Смешивают 1 мл раствора, содержащего 5 г/л *меди (II) сульфата Р* и 10 г/л *калия тартрата Р,* с 50 мл *раствора натрия карбоната Р1.*

Готовят непосредственно перед использованием.

Медно-тартратный раствор Р3. *1023303.*

Смешивают равные объёмы раствора 10 г/л *меди (II) сульфата Р* и раствора 20 г/л *натрия тартрата Р.*

К 1,0мл полученного раствора прибавляют 50 *мл .раствора натрия карбоната Р1.*

Готовят непосредственно перед использованием.

Медно-тартратный раствор Р4. *1023304.*

Раствор I. Раствор 150 г/л *меди (II) сульфата Р.*

Раствор II. 2,5 г *натрия карбоната безводного Р,* 2,5 г *калия-натрия тартрата Р,* 2,0 г *натрия гидрокарбоната Р* и 20,0 г *натрия сульфата безводного Р* растворяют в *воде Р,* доводят объём полученного раствора тем же растворителем до 100 мл.

Непосредственно перед использованием смешивают растворы I и II в соотношении 1:25.

Медно-цитратный раствор. *1023100.*

25 г *меди (II) сульфата Р,* 50 г *кислоты лимонной Р* и 144 г *натрия карбоната безводного Р* растворяют в *воде Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 1000 мл.

Медно-цитратный раствор Р1. *1023200.*

25 г *меди (II) сульфата* Р, 50 г *кислоты лимонной Р* и 144 г *натрия карбоната безводного Р* растворяют в *воде Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 1000 мл (испытуемый раствор).

Раствор корректируют так, чтобы он выдерживал следующие требования:

а) К 25,0 мл испытуемого раствора прибавляют 3 г *калия йодида Р,* затем осторожно небольшими порциями прибавляют 25 мл раствора 25% *(м/м) кислоты серной Р* и титруют *0,1 М раствором натрия тиосульфата,* используя в качестве индикатора 0,5 *ил раствора крахмала Р,* который прибавляют в конце титрования.

На титрование должно быть израсходовано от 24,5 мл до 25,5 мл *0,1М раствора натрия тиосульфата.*

b) 10,0 мл испытуемого раствора доводят *водой Р* до объёма 100,0 мл и перемешивают. К 10,0 мл полученного раствора прибавляют 25,0 *мл 0,1 М раствора кислоты хлористоводородной,* нагревают на водяной бане в течение 1 ч, охлаждают, доводят *водой Р* до начального объема и титруют *0,1 М раствором натрия гидроксида,* используя в качестве индикатора 0,1 *мл раствора фенолфталеина Р1*

На титрование должно быть израсходовано от 5,7 мл до 6,3 мл *0,1 М раствора натрия гидроксида.*

с) 10,0 мл испытуемого раствора доводят *водой Р* до объёма 100,0 мл и перемешивают. 10,0 мл полученного раствора титруют *0,1 М раствором кислоты хлористоводородной,* используя в качестве индикатора 0,1 *мл раствора фенолфталеина Р1*

На титрование должно быть израсходовано от 6,0 мл до 7,5 мл *0,1 М раствора кислоты хлористоводородной.*

Медь. Cu. *(А.м.* 63,55). *1022100.* [7440-50-8].

Фольга очищенная, стружка, проволока или металлический порошок электролитической чистоты.

Мезитилоксид. $C_6H_{10}O$. *(М.м.* 98,1). *1120100.* [141-79-7]. Метилпент-3-ен-2-он.

Бесцветная маслянистая жидкость. Растворим в 30 частях воды, смешивается с большинством органических растворителей.

d_{20}^{20}: около 0,858.

Температура кипения: от 129°C до 130°C.

Меклозина гидрохлорид. $C_{25}H_{29}Cl_3N_2$. *(М.м.* 463,9). *1051200.* [1104-22-9].

1-[(RS-(4-хлорофенил)фенилметил)]-4-(3-метилбензил)пиперазина дигидрохлорид.

Желтый или желтовато-белый кристаллический порошок. Мало растворим в воде. Растворим в 96% спирте и метиленхлориде, практически нерастворим в эфире.

Содержит не менее 98,0% и не более 102,0% $C_{25}H_{29}Cl_3N_2$ В пересчете на безводное вещество.Имеет энантиомер.

Вода (2.5.12). Не более 5%. Определение проводят из 0,200 г субстанции полумикрометодом.

Меламин. $C_3H_6N_6$. *(М.м.* 126,1). *1051300.* [108-78-1]. 1,3,5-Триазин-2,4,6-триамин.

Аморфный порошок белого цвета. Очень мало растворим в воде и 96% спирте.

Менадион. $C_{11}H_8O_2$. *(М.м.* 172,3). *1051400.* [58-27-5]. 2-метилнафталин-1,4-дион.

Содержит не менее 98,5% и не более 101,0% $C_{11}H_8O_2$ в пересчете на сухое вещество.

Бежево-желтый кристаллический порошок. Практически нерастворим в воде, легко растворим в толуоле, растворим в эфире, умеренно растворим в 96% спирте и метаноле. Светочувствителен.

Хранят в защищенном от света месте.

Ментилацетат. $C_{12}H_{22}O_2$. *(М.м.* 198,3). *1051800.* [16409-45-3].

2-Изопропил-5-метилциклогекси-лацетат.

Бесцветная жидкость. Мало растворим в воде, смешивается с 96% спиртом и эфиром.

d_{20}^{20}: около 0,92.

n_D^{20}: около 1,447.

Температура кипения: около 225°С.

Ментилацетат, используемый в газовой хроматографии, должен выдерживать следующее дополнительное испытание.

Количественное определение. Проводят методом газовой хроматографии *(2.2.28),* как указано в статье *Масло мяты перечной,* используя ментилацетат в качестве испытуемого раствора.

Площадь основного пика должна быть не менее 98,0% суммы площадей всех пиков.

Ментол. *1051600.* [2216-51-5]. См. *Левоментол* и *Ментол рацемический.*

Ментол, используемый в газовой хроматографии, должен выдерживать следующее дополнительное испытание.

Количественное определение. Проводят методом газовой хроматографии *(2.2.28),* как указано в статье *Ментол рацемический* в испытании «Сопутствующие примеси», используя ментол в качестве испытуемого раствора.

Площадь основного пика должна быть не менее 98.0% суммы площадей всех пиков, за исключением пика растворителя.

Ментол рацемический. $C_{10}H_{22}O$. *(М.м.* 156,3). *1051600.* [2216-51-5]. (1RS,2SR,5RS)-5-метил-2-(1-метилэтил)циклогексанол.

Кристаллический порошок сыпучий или в виде агломератов или призматический или отчасти бесцветные блестящие кристаллы. Практически нераствормв в воде, очень легко растворим в 96% спирте, эфире, легко растворим в жирных маслах и вазелиновом масле, очень мало растворим в глицерине.. Плавится при температуре около 34°С. Имеет энантиомер.

Оптическое вращение (2.2.7). От +0,2° до –0,2°. Определение проводят используя раствор 100 г/л субстанции в *96% спирте Р*.

Хранят в прохладном месте.

Ментон. $C_{10}H_{18}O$. *(М.м.* 154,2). *1051700.* [14073-97-3].

(2S,5R)-2-Изопропил-5-метилциклогексанон. (-)-транс-n-Ментан-3-он.

Содержит различные количества изоментона.

Бесцветная жидкость. Очень мало растворим в воде, очень легко растворим в 96% спирте и эфире.

d_{20}^{20}: около 0,897.

n_D^{20}: около 1,450.

Ментон, используемый в газовой хроматографии, должен выдерживать следующее дополнительное испытание.

Количественное определение. Проводят методом газовой хроматографии *(2.2.28),* как указано в статье *Масло мяты перечной,* используя ментон в качестве испытуемого раствора.

Площадь основного пика должна быть не менее 90,0% суммы площадей всех пиков.

Ментофуран. $C_{10}H_{14}0$. *(М.м.* 150,2). *1051500.* [17957-94-7].

3,9-Эпокси-n-мента-3,8-диен. 3,6-Диметил-4,5,6,7-тетрагидробензофуран.

Жидкость слегка синеватого цвета. Очень мало растворим в воде, растворим в 96% спирте.

d_{15}^{20} : около 0,965

n_D^{20} : около 1,480.

$[a]_D^{20}$: около +93°.

Температура кипения: 196°С.

Ментофуран, используемый в газовой хроматографии, должен выдерживать следующее дополнительное испытание.

Количественное определение. Проводят методом газовой хроматографии *(2.2.28),* как указано в статье *Масло мяты перечной,* используя ментофуран в качестве испытуемого раствора.

Площадь основного пика должна быть не менее 97,0% суммы площадей всех пиков.

Меркаптопурин. $C_5H_4N_4S \cdot H_2O$. *(М.м.* 170,2). *1051900.* [6112-76-1]. 7*H*-пурин-6-тиол.

Содержит не менее 98,5% и не более 101,0% $C_5H_4N_4S$ в пересчете на безводное вещество.

Кристаллический порошок желтого цвета. Практически нерастворим в воде и эфире, мало растворим в 96% спирте. Растворяется в растворах гидроксидов щелочных металлов.

Вода (2.5.12). От 10% до 12%. Определение проводят из 0,250 г субстанции полумикрометодом.

Хранят в защищенном от света месте.

2-Меркаптоэтанол. C_2H_6OS. *(М.м.* 78,1). *1099300.* [60-24-2].

Жидкость. Смешивается с водой.

d_{20}^{20} : около 1,116.

Температура кипения: около 157°С.

Метакриловая кислота. $C_4H_6O_2$. *(М.м.* 86,1). *1101800.* [79-41-4].

2-Метилпроп-2-еновая кислота.

Бесцветная жидкость.

n_D^{20} : около 1,431.

Температура кипения: около 160°С.

Температура плавления: около 16°С.

Метаниловый жёлтый. $C_{18}H_{14}N_3NaO_3S$. *(М.м.* 375,4). *1052900.* [587-98-4]. Показатель Шульца №169. Цветной индекс №13065. Натрия 3-[4-(фениламино)фенилазо]бензолсульфонат.

Порошок коричневато-жёлтого цвета. Растворим в воде и 96% спирте, очень мало растворим в эфире.

Метанилового жёлтого раствор. *1052901.* Раствор 1 г/л в *метаноле Р.*

Испытание на чувствительность. К 50 мл *кислоты уксусной безводной Р* прибавляют 0,1 мл раствора метанилового жёлтого; появляется розовато-красное окрашивание, которое должно перейти в фиолетовое при прибавлении 0,05 мл *0,1 М раствора кислоты хлорной.*

Изменение окраски. От красной до оранжево-жёлтой в интервале pH 1,2-2,3.

Метанол. CH_4O. *(М.м.* 32,04). *1053200.* [67-56-1].

Прозрачная, бесцветная, воспламеняющаяся жидкость. Смешивается с водой и 96% спиртом.

d_{20}^{20} : от 0,791 до 0,793.

Температура кипения: от 64°С до 65°С.

Метанол Р1. *105320J.*

Должен выдерживать требования для *метанола Р* и следующее дополнительное испытание.

Минимальное пропускание (2.2.25) определяют, используя в качестве компенсационной жидкости *воду Р:*

20% при длине волны 210 нм,

50% при длине волны 220 нм,

75% при длине волны 230 нм,

95% при длине волны 250 нм,

98% при длине волны 260 нм и более.

Метанол Р2. *1053202.*

Метанол Р2, используемый в жидкостной хроматографии, должен выдерживать следующие дополнительные испытания.

Содержит не менее 99,8% CH_4O *(М.м.* 32,04).

Оптическая плотность (2.2.25). Не более 0,17. Измеряют при длине волны 225 нм, используя в качестве компенсационной жидкости *воду Р.*

Метанол подкисленный. *1053203.*

1,0 мл *кислоты хлористоводородной Р1* доводят *метанолом* Р до объёма 100,0 мл.

Метанол безводный. *1053400.* [67-56-1].

1000 мл *метанола Р* обрабатывают 5 г *магния Р.* Если необходимо, инициируют реакцию, прибавляя 0,1 мл *раствора ртути (II) хлорида Р.* После прекращения выделения газа жидкость перегоняют, отгон собирают в сухой контейнер и защищают от влаги.

Вода (2.5.12). Не более 0,3 г/л.

Метанол, свободный от альдегидов. *1053300.*

25 г *йода Р* растворяют в 1 *л метанола Р,* полученный раствор прибавляют при постоянном помешивании к 400 мл 1 *М раствора натрия гидроксида,* затем прибавляют 150 мл *воды Р* и оставляют на 16 ч. Фильтруют и кипятят с обратным холодильником до исчезновения запаха йодоформа. Раствор перегоняют фракционной перегонкой.

Содержит не более 0,001% альдегидов и кетонов.

Метансульфоновая кислота. CH_4O_3S. (*М.м.* 96,1). *1053100.* [75-75-2].

Прозрачная, бесцветная жидкость, затвердевающая при температуре около 20°С. Смешивается с водой, мало растворима в толуоле, практически нерастворима в гексане.

d_{20}^{20}: около 1,48.

n_D^{20}: около 1,430.

Метафосфорная кислота. $(HPO_3)_X$. *1053000.* [37267-86-0].

Стекловидные комочки или палочки, содержащие определенное количество натрия метафосфата. Гигроскопична, очень легко растворима в воде.

Нитраты. 1,0 г кипятят с 10 мл *воды Р,* охлаждают, прибавляют 1 мл *раствора индигокармина Р,* 10 мл *кислоты серной, свободной от азота, Р* и нагревают до кипения. Синяя окраска не должна полностью исчезнуть.

Восстанавливающие вещества. Не более 0,01%, в пересчете на H_3PO_3. 35,0 г растворяют в 50 мл *воды Р,* прибавляют 5 мл раствора 200 г/л *кислоты серной Р,* 50 мг *калия бромида Р* и 5.0 мл *0,02 М раствора калия бромата* и нагревают на водяной бане в течение 30 мин; охлаждают, прибавляют 0,5 г *калия йодида Р к* титруют выделившийся йод *0,1 М раствором натрия тиосульфата,* используя в качестве индикатора 1 *мл раствора крахмала Р.* Проводят контрольный опыт.

1 мл *0,02 М раствора калия бромата* соответствует 4,10 мг H_3PO_3.

Хранят в воздухонепроницаемом контейнере.

4-Метиламинофенола сульфат. $C_{14}H_{20}N_2O_6S$. *(М.м.* 344,4). *1053800.* [55-55-0].

Бесцветные кристаллы. Очень легко растворим в воде, мало растворим в 96% спирте, практически нерастворим в эфире.

Температура плавления: около 260°С.

Метилантранилат. $C_8H_9NO_2$. *(М.м.* 151,2). *1107300.* [134-20-3].

Метил-2-аминобензоат.

Бесцветные кристаллы или жидкость от бесцветного до желтоватого цвета. Растворим в воде, легко растворим в 96% спирте и эфире.

Температура плавления: от 24°С до 25°С.

Температура кипения: от 134°С до 136°С.

Метилантранилат, используемый в газовой хроматографии, должен выдерживать следующее дополнительное испытание.

Количественное определение. Проводят методом газовой хроматографии *(2.2.28),* как указано в статье *Масло цветков померанца,* используя метилантранилат в качестве испытуемого раствора.

Площадь основного пика должна быть не менее 95,0% суммы площадей всех пиков.

Метиларахидат. $C_{21}H_{42}O_2$. *(М.м.* 326,6). *1053900.* [1120-28-1]. Метилэйкозаноат.

Содержит не менее 98,0% $C_{21}H_{42}O_2$ Определение проводят методом газовой хроматографии *(2.4.22).*

Кристаллическая масса от белого до жёлтого цвета. Растворим в 96% спирте и петролейном эфире.

Температура плавления: около 46°C.

Мегилацетат. $C_3H_6O_2$. *(М.м.* 74,1). *1053700.* [79-20-9].

Прозрачная, бесцветная жидкость. Растворим в воде, смешивается с 96% спиртом.

d_{20}^{20} : около 0,933.

n_D^{20} : около 1,361.

Температура кипения: от 56°C до 58°C.

Метилбегенат. $C_{23}H_{46}O_2$. *(М.м.* 354,6). *1107500.* [929-77-1]. Метилдокозаноат.

Температура плавления: от 54°C до 55°C.

Метилбензол. См. *Толуол.*

Метилбензотиазолонгидразона гидрохлорид. $C_8H_{10}ClN_3S,H_2O$ *(М.м.* 233,7). *1055300.* [38894-11-0].
3-Метилбензотиазол-2(3Н)-он гидразона гидрохлорид моногидрат.

Кристаллический порошок почти белого или желтоватого цвета.

Температура плавления: около 270°C.

Испытание на пригодность для определения альдегидов. К 2 мл *метанола, свободного от альдегидов, Р* прибавляют 60 мкл раствора 1 г/л *пропионового альдегида Р* в *метаноле, свободном от альдегидов, Р* и 5 мл раствора 4 г/л метилбензотиазолонгидразона гидрохлорида, смешивают и оставляют на 30 мин. Готовят контрольный раствор, не содержащий пропионовый альдегид. К испытуемому и контрольному раствору прибавляют по 25,0 мл раствора 2 г/л *железа (III) хлорида,* доводят объём каждого раствора *ацетоном Р* до 100,0 мл и перемешивают. Оптическая плотность *(2.2.25)* испытуемого раствора, измеренная при длине волны 660 нм с использованием в качестве компенсационной жидкости контрольного раствора, должна быть не менее 0,62.

2-Метилбутан. C_5H_{12}.(*М.м.* 72,2). *1099500.* [78-78-4]. Изопентан.

Содержит не менее 99,5% C_5H_{12}.

Бесцветная, легко воспламеняющаяся жидкость.

d_{20}^{20} : около 0,621.

n_D^{20} *:* около 1,354.

Температура кипения: около 29°C.

Вода (2.5.12). Не более 0,02%.

Остаток после выпаривания. Не более 0,0003%.

Минимальное пропускание (2.2.25) определяют, используя в качестве компенсационной жидкости *воду Р:*
50% при длине волны 210 нм,
85% при длине волны 220 нм,
98% при длине волны 240 нм и более.

2-Метилбут-2-ен. C_5H_{10} *(М.м.* 70.1). *1055400.* [513-35-9].

Очень легко воспламеняющаяся жидкость. Практически не растворим в воде, смешивается с 96% спиртом и эфиром.

Температура кипения: от 37.5°C до 38.5°C.

Метилдеканоат. $C_{11}H_{22}O_2$. *(М.м.* 186,3).1054000. [110-42-9]. Метил-н-деканоат.

Содержит не менее 99,0% $C_{11}H_{22}O_2$.

Прозрачная, бесцветная или жёлтого цвета жидкость. Растворим в петролейном эфире.

d_{20}^{20}: от 0,871 до 0,876.

n_D^{20}: от 1,425 до 1,426.

Посторонние примеси. Определение проводят методом газовой хроматографии *(2.2.28),* хроматографируя равные объёмы каждого из следующих растворов веществ: (I) раствор 0,02 г/л метилдеканоата *в углерода дисульфиде Р,* (II) раствор 2 г/л метилдеканоата *в углерода дисульфиде Р,* (III) *углерода дисульфид Р.* Хроматографируют в условиях испытания на бутилгидрокситолуол, указанных в статье *Ланолин.*

На хроматограмме раствора (II) сумма площадей всех пиков, кроме основного пика и пика растворителя, должна быть меньше чем площади основного пика на хроматограмме раствора (I).

3-О-Метилдопамина гидрохлорид. $C_9H_{14}ClNO_2$. *(М.м.* 203,7). *1055600.* [1477-68-5]. 4-(2-Амино-этил)-2-метоксифенола гидрохлорид.

Температура плавления: от 213°C до 215°C.

Хроматография. Определение проводят, как указано в статье *Допамина гидрохлорид;* наносят 10 мкл раствора 0,075 г/л в *метаноле Р.* На хроматограмме должно быть только одно основное пятно.

4-О-Метилдопамина гидрохлорид. $C_9H_{14}ClNO_2$. *(М.м.* 203,7). *1055700.* [645-33-0].

5-(2-Амино-этил)-2-метоксифенола гидрохлорид.

Температура плавления: от 207°C до 208°C.

Хроматография. Определение проводят, как указано в статье *Допамина гидрохлорид;* наносят 10 мкл раствора 0,075 г/л в *метаноле Р.* На хроматограмме должно быть только одно основное пятно.

2-Метил-5-нитроимидазол. $C_4H_5N_3O_2$. *(М.м.* 127,1). *1056100.* [88054-22-2].

Порошок от белого до светло-жёлтого цвета.

Температура плавления: от 252°C до 254°C.

Метиленбисакриламид. $C_7H_{10}N_2O_2$. *(М.м.* 154,2). *1056000.* [110-26-9].

N,N'-Метиленбиспропенамид.

Очень мелкий порошок белого или почти белого цвета. Мало растворим в воде, растворим в 96% спирте.

Температура плавления: 300°C с разложением.

Метиленовый синий. $C_{,6}H_{18}ClN_3S{\cdot}xH_2O$. *(М.м.* 319,9, безводный). *1055800.* [7220-79-3]. Показатель Шульца №1038. Цветной индекс №52015.

3,7-Диметиламинофенотиазина-5 хлорид.

Существует в различных гидратированных формах и может содержать до 22% воды.

Кристаллический порошок темно-зелёного или бронзового цвета. Легко растворим в воде, растворим в 96% спирте.

Метиленового синего раствор.

0,15 г метиленового *синего Р* растворяют в *воде Р* и доводят объем раствора этим же растворителем до 100 мл.

Метиленхлорид. CH_2Cl_2. *(М.м.* 84,9). *1055900.* [75-09-2]. Дихлорметан.

Бесцветная жидкость. Умеренно растворим в воде, смешивается с 96% спиртом и эфиром.

Температура кипения: от 39°С до 42°С.

Метиленхлорид, используемый в флуориметрии, должен выдерживать следующее дополнительное испытание.
Флуоресценция. При облучении светом с длиной волны 365 нм поглощение *(2.2.21),* измеренное при длине волны 460 нм в кювете с толщиной слоя 1 см, не должно быть интенсивнее поглощения раствора, содержащего 0.002 ppт *хинина Р* в *0,5 М растворе кислоты серной,* измеренной в тех же условиях.

Метиленхлорид подкисленный. *1055901.*

К 100 мл *метиленхлорида Р* прибавляют 10 мл *кислоты хлористоводородной Р,* встряхивают. После разделения слоев используют нижний слой.

Метилизобутилкетон. $C_6H_{12}O$. *(М.м.* 100,2). *1054300.* [108-10-1].

4-Метил-2-пентанон.

Прозрачная, бесцветная жидкость. Мало растворим в воде, смешивается с большинством органических растворителей.

d_{20}^{20}: около 0,80.

Температура кипения: около 115°С.

Температурные пределы перегонки (2.2.11). Перегоняют 100 мл. Интервал температуры перегонки не должен превышать 4,0°С; должно перегоняться от 1 мл до 95 мл.

Остаток после выпаривания. Не более 0,01%. Выпаривают на водяной бане, остаток сушат при температуре от 100°С до 105°С.

Метилизобутилкетон Р1. *1054301.*

50 мл свежеперегнанного *метилизобутилкетона Р* встряхивают с 0,5 мл *кислоты хлористоводородной Р1* в течение 1 мин. После разделения слоев нижний слой отбрасывают.

Готовят непосредственно перед использованием.

Метилкапрат. *1054000. См. Метилдеканоат Р.*

Метилкаприлат. $C_9H_{18}O_2$. *(М.м.* 158,2). *1120400.* [111-11-5]. Метилоктаноат.

d_{20}^{20}: около 0,876.

n_D^{20}: около 1,417.

Температура кипения: от 193°С до 194°С.

Метилкапроат. $C_7H_{14}O_2$.(*М.м.* 130,2). *1120300.* [106-70-7]. Метилгексаноат.

d_{20}^{20}: около 0,885.

n_D^{20}: около 1,405

Температура кипения: от 150°C до 151°C.

Метиллаурат. $C_{13}H_{26}O_2$. *(М.м.* 214,4). *1054400.* [111-82-0]. Метилдодеканоат.

Содержит на менее 98,0% $C_{13}H_{26}O_2$. Определение проводят методом газовой хроматографии *(2.4.22).*

Бесцветная или жёлтого цвета жидкость. Растворим в 96% спирте и петролейном эфире.

d_{20}^{20}: около 0,87.

n_D^{20}: около 1,431.

Температура плавления: около 5°C.

Метиллигноцерат. $C_{25}H_{50}O_2$. *(М.м.* 382,7). *1120600.* [557-59-5]. Метилтетракозаноат.

Хлопья.

Температура плавления: около 58°C.

Метиллинолеат. $C_{19}H_{34}O_2$. *(М.м.* 294,5). *1120700.* [112-63-0].

Метил-цис,цис-9,12-октадекадиеноат.

d_{20}^{20}: около 0,888.

n_D^{20}: около 1,466.

Температура кипения: от 207°C до 208°C.

Метиллиноленат. $C_{19}H_{32}O_2$. *(М.м.* 292,5). *1120800.* [301-00-8].

*Метил-цис,цис,цис—9,*12,15-октадекатриеноат.

d_{20}^{20}: около 0,901.

n_D^{20}: около 1,471.

Температура кипения: около 207°C.

Метилмаргарат. $C_{18}H_{36}O_2$. *(М.м.* 284,5). *1120900.* [1731-92-6]. Метилгептадеканоат.

Температура плавления: от 32°C до 34°C.

Метилметакрилат. $C_5H_8O_2$. *(М.м.* 100,1). *1054500.* [80-62-6].

Метил-2-метилпроп-2-еноат.

Бесцветная жидкость.

d_{20}^{20}: около 1,414.

Температура кипения: около 100°C.

Температура плавления: около -48°C.

Содержит подходящий стабилизирующий реагент.

Метилмиристат. $C_{15}H_{30}O_2$. *(М.м.* 242,4). *1054600.* [124-10-7]. Метилтетрадеканоат.

Содержит не менее 98,0% $C_{15}H_{30}O_2$. Определение проводят методом газовой хроматографии *(2.4.22).*

Бесцветная или слабо жёлтого цвета жидкость. Растворим в 96% спирте и петролейном эфире.

d_{20}^{20}*:* около 0,87.

n_D^{20}: около 1,437.

Температура плавления: около 20°C.

Метиловый зелёный. $C_{26}H_{33}Cl_2N_3$. *(М.м.* 458,5). *1054200.* [7114-03-6]. Показатель Шульца №788. Цветной индекс №42585. 4-[[4-(Диметиламино)-фенил][4-(диметилиминио)циклогекса-2,5-дие-нилиден]-метил фенил]триметиламмония дихлорид.

Порошок зелёного цвета. Растворим в воде, растворим в кислоте серной с образованием жёлтого окрашивания переходящего в зелёное при разведении водой.

Метилового зелёного-йодомеркуратная бумага. *1054201.*

Тонкие полоски подходящей фильтровальной бумаги погружают в раствор 40 г/л *метилового зелёного Р,* сушат на воздухе, затем погружают их на 1 ч в раствор, содержащий 140 г/л *калия йодида Р* и 200 г/л *ртути(II) йодида Р.* Полоски промывают *водой дистиллированной* Р до тех пор, пока промывные воды не станут практически бесцветными, и сушат на воздухе.

Хранят в защищённом от света месте. Срок годности 2 сут.

Метиловый красный. $C_{15}H_{15}N_3O_2$. *(М.м.* 269,3). *1055100.* [493-52-7]. Показатель Шульца №250. Цветной индекс №13020. 2-(4-Диметиламинофенилазо)бензойная кислота.

Порошок тёмно-красного цвета или кристаллы фиолетового цвета. Практически нерастворим в воде, растворим в 96% спирте.

Метилового красного смешанный раствор. *1055101.*

0,1 г *метилового красного Р* и 50 мг *метиленового синего Р* растворяют в 100 мл 96% *спирта Р.*

Изменение окраски. От красно-фиолетовой до зелёной в интервале pH 5,2-5,6.

Метилового красного раствор. *1055102.*

50 мг растворяют в смеси 1,86 мл *0,1 М раствора натрия гидроксида* и 50 мл 96% *спирта Р,* доводят объём раствора *водой* Р до 100 мл.
Испытание на чувствительность. К 100 мл *воды, свободной от углерода диоксида, Р* прибавляют 0,1 мл раствора метилового красного и 0,05 мл *0,02 М раствора кислоты хлористоводородной;* появляется красное окрашивание, которое должно перейти в жёлтое при прибавлении не более 0,1 мл *0,02 М раствора натрия гидроксида.*

Изменение окраски. От красной до жёлтой в интервале pH 4,4-6,0.

Метиловый оранжевый. $C_{14}H_{14}N_3NaO_3S$. *(М.м.* 327,3). *1054800.* [547-58-0]. Показатель Шульца №176. Цветной индекс №13025.

Натрия 4'-(диметиламино)азобензол-4-сульфонат.

Кристаллический порошок оранжево-жёлтого цвета. Мало растворим в воде, практически нерастворим в 96% спирте.

Метилового оранжевого смешанный раствор. *1054801.*

20 мг *метилового оранжевого Р* и 0,1 г *бромкрезолового зелёного Р* растворяют в 1 мл *0,2 М раствора натрия гидроксида* и доводят объём раствора *водой Р* до 100 мл.

Изменение окраски. От оранжевой до желтовато-зелёной в интервале pH 3,0-4,4.

Метилового оранжевого раствор. *1054802.*

0,1 г *метилового оранжевого Р* растворяют в 80 мл *воды Р* и доводят объём раствора 96% *спиртом Р до* 100 мл.

Испытание на чувствительность. К 100 мл *воды, свободной от углерода диоксида, Р* прибавляют 0,1 мл раствора метилового оранжевого; появляется жёлтое окрашивание, которое должно перейти в красное при прибавлении не более 0,1 мл *0,1 М раствора кислоты хлористоводородной.*

Изменение окраски. От красной до жёлтой в интервале pH 3,0-4,4.

Метилолеат. $C_{19}H_{36}O_2$. *(М.м.* 296,4). *1054700.* [112-62-9]. Метил-(Z)-октадек-9-еноат.

Содержит не менее 98,0% $C_{19}H_{36}O_2$. Определение проводят методом газовой хроматографии *(2.4.22).*

Бесцветная или слабо-жёлтого цвета жидкость. Растворим в 96% спирте и петролейном эфире.

d_{20}^{20}: около 0,88.

n_D^{20}: около 1,452.

Метилпальмитат. $C_{17}H_{34}O_2$. *(М.м.* 270,5). *1054900.* [112-39-0]. Метилгексадеканоат.

Содержит не менее 98,0% $C_{17}H_{34}O_2$. Определение проводят методом газовой хроматографии *(2.4.22).*

Кристаллическая масса белого или жёлтого цвета. Растворим в 96% спирте и петролейном эфире.

Температура плавления: около 30°С.

Метилпальмитолеат. $C_{17}H_{32}O_2$. *(М.м.* 268,4). *1121000.* [1120-25-8].

Метил-цыс-9-гексадеканоат.

d_{20}^{20}: около 0,876.

n_D^{20}: около 1,451.

Метилпарагидроксибензоат. $C_8H_8O_3$. *(М.м.* 122,1). *1055000.* [99-76-3].

Метил-4-гидроксибензоат. Нипагин.

Содержит не менее 99,0% и не более 100,5% $C_8H_8O_3$.

Кристаллический порошок белого цвета или бесцветные кристаллы. Очень мало растворим в воде, легко растворим в 96% спирте и метаноле.

Температура плавления: от 125°С до 128°С.

4-Метилпентан-2-ол. $C_6H_{14}O$. *(М.м.* 102,2). *1114300.* [108-11-2].

Прозрачная, бесцветная, летучая жидкость.

d_{20}^{20}*:* около 0,802.

n_D^{20}: около 1,411.

Температура кипения: около 132°С.

Метилпиперазин. $C_5H_{12}N_2$. *(М.м.* 100.2). *1056300.* [74879-18-8]. 1-Метилпиперазин.

Бесцветная жидкость. Смешивается с водой и 96% спиртом.

d_{20}^{20}: около 0,90.

n_D^{20}: около 1,466.

Температура кипения: около 138°С.

4-(4-Метилпиперидино)пиридин. $C_{11}H_{16}N_2$. *(М.м.* 176,3). *1114400.* [80965-30-6].

Прозрачная жидкость.

n_D^{20} : около 1,565.

2-Метилпропанол. $C_4H_{10}O$. *(М.м.* 74,1). *1056400.* [78-83-1].

Изобутиловый спирт. 2-Метилпропан-1-ол.

Прозрачная, бесцветная жидкость. Растворим в воде, смешивается с 96% спиртом и эфиром.

d_{20}^{20} : около 0,80.

n_D^{15} : от 1,397 до 1,399.

Температура кипения: около 107°С.

Температурные пределы перегонки (2.2.11). От 107°С до 109°С; должно перегоняться не менее 96%.

2-Метил-2-пропанол. $C_4H_{10}0$. *(М.м.* 74,1). *1056500.* [75-65-0]. 1,1-Диметилэтиловый спирт. *Трет*-Бутиловый спирт.

Прозрачная, бесцветная жидкость или кристаллическая масса. Растворим в воде, смешивается с 96% спиртом и эфиром.

Температура затвердевания (2.2. 18): около 25°С.

Температурные пределы перегонки (2.2.11). От 81°С и 83°С; должно перегоняться не менее 95%.

Метилстеарат. $C_{19}H_{38}O_2$ *(М.м.* 298,5). *1055200.* [112-61-8]. Метилоктадеканоат.

Содержит не менее 98,0% $C_{19}H_{38}O_2$. Определение проводят методом газовой хроматографии *(2.4.22).*

Кристаллическая масса белого или жёлтого цвета. Растворим в 96% спирте и петролейном эфире.

Температура плавления: около 38°С.

Мегилтридеканоат. $C_{14}H_{28}O_2$. *(М.м.* 228,4). *1121100.* [1731-88-0].

Бесцветная или слабо желтого цвета жидкость. Растворим в 96% спирте и петролейном эфире.

d_{20}^{20} : около 0,86.

n_D^{20} : около 1,441.

Температура плавления: около 6°С.

Метилтрикозаноат. $C_{24}H_{48}O_2$. *(М.м* 368.6). *1111500.* [2433-97-8]. Метиловый эфир трикозановой кислоты.

Содержит не менее 99,0% $C_{24}H_{48}O_2$.

Кристаллы белого цвета. Практически не растворим в воде, растворим в гексане.

Температура плавления: от 55°С до 56°С.

Метилфенилоксазолилбензол. $C_{26}H_{20}N_2O_2$. *(М.м.* 392,5). *1056200.* [3073-87-8].

1,4-Бис[2-(4-метил-5-фенил)оксазолил]-бензол.

Мелкий порошок зеленовато-жёлтого цвета с синей флуоресценцией или мелкие кристаллы. Растворим в 96% спирте, умеренно растворим в ксилоле.

Температура плавления: около 233°С.

Метилфенилоксазолилбензол, используемый для жидкостной сцинтилляции, должен быть соответствующей степени чистоты.

Метилфталеин. См. *Фталеиновый пурпурный.*

Метилцеллюлоза 450. *1055500.* [9004-67-5]. *O*-метилированная целлюлоза.

Порошок белого, желто-белого или серовато-белого цвета или гранулы. Гигроскопичный после высушивания. Практически нерастворим в горячей воде, ацетоне, этаноле, эфире и толуоле. Растворяется в холодной воде с образование колоидного раствора.

Номинальная вязкость: 450 мПа с.

Потеря в массе при высушивании (2.2.32). Не более 10,0%. 1,000 г субстанции сушат при температуре от 100°С до 105°С.

Метилциннамат. $C_{10}H_{10}O_2$. *(М.м.* 162,2). *1099400.* [103-26-4].

Бесцветные кристаллы. Практически нерастворим в воде, растворим в 96% спирте и эфире.

n_D^{20}: около 1,56.

Температура кипения: около 260°С.

Температура плавления: от 34°С до 36°С.

Метилэтилкетон. C_4H_8O. *(М.м.* 72,1). *1054100.* [78-93-3]. Этилметилкетон.

2-Бутанон.

Прозрачная, бесцветная, воспламеняющаяся жидкость. Очень легко растворим в воде, смешивается с 96% спиртом и эфиром.

d_{20}^{20}: около 0,81.

Температура кипения: от 79°С до 80°С.

Метилэйкозеноат. $C_{20}H_{38}O_2$.(М.м. 310,5). *1120500.* Метил-цис-11-эйкозеноат.

Метимазол. См. *Тиамазол.*

L-Метионин. $C_5H_{11}NO_2S$. (*М.м*. 149,2). *1053500.* [63-68-3].

(S)-2-амино-4-(метилтио)бутановая кислота. Метионин.

Содержит не менее 99,0% и не более 101,0% $C_5H_{11}NO_2S$. в пересчете на сухое вещество.

Кристаллический порошок белого или почти белого цвета или бесцветные кристаллы. Растворим в воде, очень мало растворим в 96% спирте, практически нерастворим в эфире.

pH (2.2.3):от 5,5 до 6,5. Измеряют pH раствора 25 г/л в *воде, свободной от углерода диоксида Р*.

$[\alpha]_D^{20}$: от +22,5° до +24,0° в пересчете на сухое вещество. 1,00 г субстанции растворяют в *кислоте хлористоводородной Р1* и доводят объем раствора тем же растворителем до 50,0 мл.

Потеря в массе при высушивании (2.2.32). Не более 0,5%. 1,000 г субстанции сушат при температуре от 100 ° С до 105 ° С.

Хранят в плотно укупоренном контейнере, в защищенном от света месте.

Метоксифенилуксусная кислота. $C_9H_{10}O_3$. *(М.м.* 166,2). *1053600.* [7021-09-2].

(RS)-2-Метокси-2-фенилуксусная кислота.

Кристаллический порошок белого цвета или кристаллы белого или почти белого цвета. Умеренно растворима в воде, легко растворима в 96% спирте и эфире.

Температура плавления: около 70°C.

Хранят в прохладном месте.

Метоксифенилуксусной кислоты реактив. *1053601.*

2,7 г *кислоты Метоксифенилуксусной Р* растворяют в 6 мл *раствора тетраметиламмония гидроксида Р* и прибавляют 20 мл *этанола Р.*

Хранят в полиэтиленовом контейнере.

(RS)-Метотрексат. *1120200.*

Содержит не менее 96,0% $C_{20}H_{22}N_8O_5$.

Температура плавления: около 195°C.

 # Миллона реактив.

10 г *ртути (I) азотнокислой Р* растворяют в 8,5 мл *кислоты азотной разведенной Р1* и разбавляют двойным объемом *воды Р*. Прозрачный раствор сливают.

Миозмин. $C_9H_{10}N_2$. *(М.м.* 146,2). *1121200.* [532-12-7].

3-(4,5-Дигидро-3H-пиррол-2-ил)пиридин.

Бесцветные кристаллы.

Температура плавления: около 45°C.

Миристиловый спирт. $C_{14}H_{30}O$. *(М.м.* 214,4). *11121300.* 1-Тетрадеканол.

d_{20}^{20}: около 0,823.

Температура плавления: от 38°C до 40°C.

Миристицин. $C_{11}H_{12}O_3$. *(М.м.* 192,2). *1099600.* [607-91 -0]. 5-Аллил-1 -метокси-2,3-метилендиок-сибензол. 4-Метокси-6-(проп-2-енил)-1,3-бензодиоксол.

Бесцветная маслянистая жидкость. Практически нерастворим в воде, мало растворим в этаноле, растворим в эфире, смешивается с толуолом и ксилолом.

d_{20}^{20}: около 1,144.

n_D^{20}: около 1,540.

Температура кипения: от 276°C до 277°C.

Температура плавления: около 173°C.

Хроматография. Определение проводят, как указано в статье *Бадьян обыкновенный;* на полученной хроматограмме должно обнаруживаться только одно основное пятно.

Хранят в прохладном, защищённом от света месте.

β-Мирцен.$C_{10}H_{16}$. (*М.м.* 136,2). *1114500.* [123-35-3].

7-Метил-3-метиленокта-1,6-диен.

Маслянистая жидкость с приятным запахом. Практически не растворим в воде, смешивается с 96% спиртом, растворим в эфире и кислоте уксусной ледяной, растворим в растворах гидроксидов щелочных металлов.

d_{20}^{20}: около 0,794.

n_D^{20}: около 1,470.

β-Мирцен, используемый в газовой хроматографии, должен выдерживать следующее дополнительное испытание.

Количественное определение. Проводят методом газовой хроматографии *(2.2.28),* как указано в статье *Масло мяты перечной.*

Испытуемый раствор. Испытуемая субстанция.

Площадь основного пика должна быть не менее 90,0% суммы площадей всех пиков.

Молекулярное сито. *1056600.*

Молекулярное сито состоит из натрия алюмосиликата. Имеет вид шариков с размерами пор 0,4 нм и диаметром 2 мм.

Молибденовая кислота. H_2MoO_4. (*М.м.* 161,97).

Белый или белый с желтоватым оттенком порошок.

Молибденованадиевый реактив. *1056700.*

В стакане вместимостью 150 мл смешивают растёртые в порошок 4 г *аммония молибдата Р и* 0,1 г *аммония ванадата Р,* прибавляют 70 мл *воды Р* и перемешивают стеклянной палочкой до растворения. Через несколько минут должен получиться прозрачный раствор, к которому прибавляют 20 мл *кислоты азотной Р* и доводят объём раствора *водой* Р до 100 мл.

Молочная кислота. $C_3H_6O_3$. (*М.м.* 90,1).*1047800.* [50-21-5].

Содержит 88,0% *(м/м)* до 92,0% *(м/м)* $C_3H_6O_3$.

Бесцветная или слегка желтоватая сиропообразная жидкость. Смешивается с водой и 96% спиртом.

Молочная кислота – смесь 2-гидроксипропановой кислоты и продукктов ее конденсации и воды, соотношение которых зависит от температуры и концентрации. Имеет энантиомер и обычно представляет собой рацемат.

Молочной кислоты реактив. *1047801.*

Раствор А. К 60 мл *кислоты молочной Р* прибавляют 45 мл *раствора кислоты молочной Р,* насыщенного без нагревания *Суданом красным GP* и предварительно отфильтрованного. Кислота молочная насыщается медленно без нагревания, поэтому всегда необходим избыток красителя.

Раствор В. Готовят 10 мл насыщенного раствора *анилина Р* и фильтруют.

Раствор С. 75 мг *калия йодида* Р растворяют в *воде Р* и доводят тем же растворителем до объёма 70 мл. К полученному раствору прибавляют 10 мл *96% спирта* Р и 0,1 г *йода Р,* встряхивают.

Смешивают растворы А и В, прибавляют раствор С.

Морфина гидрохлорид. $C_{17}H_{20}ClNO_3 \cdot 3H_2O$.*(М.м.* 375,8). *1056900.* 7,8-дидегидро-4,5α -эпокси-17-метилморфинан-3,6α -диол гидрохлорид.

Белый или почти белый кристаллический порошок или бесцветные игольчатые или кубические кристаллы. Растворим в воде, глицерине, мало растворим в 96% спирте.

Потеря в массе при высушивании (2.2.32). От 12% до 15%. Определяется из 0,500 г субстанции при температуре 130^{o}C.

Хранят в защищенном от света месте.

Морфолин. C_4H_9NO. *(М.м.* 87,1). *1057000.* [110-91-8]. Тетрагидро-1,4-оксазин.

Бесцветная, гигроскопичная, воспламеняющаяся жидкость. Растворим в воде и 96% спирте.

d_{20}^{20} :.около 1,01.

Температурные пределы перегонки (2.2.11). От 126°C до 130°C; должно перегоняться не менее 95%.

Хранят в воздухонепроницаемом контейнере.

Мочевина. CH_4N_2O. *(М.м.* 60,1). *1095000.* [57-13-6]. Карбамид.

Содержит не менее 99,0% и не более 101,0% CH_4N_2O в пересчете на сухое вещество.

Белый кристаллический порошок или прозрачные кристаллы. Слегка гигроскопичен. Очень легко растворима в воде, растворима в 95% спирте, практически нерастворима в метиленхлориде.

Потеря в массе при высушивании (2.2.32). Не более 1%. Определяется из 1,000 г субстанции при температуре от 100^{o}C до 105^{o}C в течение 1 ч.

Муравьиная кислота безводная. CH_2O_2. *(М.м.* 46,03). *1039300.* [64-18-6].

Содержит не менее 98,0*% (м/м)* CH_2O_2.

Бесцветная жидкость. Вызывает коррозию, смешивается с водой и 96% спиртом.

d_{20}^{20} : около 1,22.

Количественное определение. 10 *мл воды Р* помещают в коническую колбу, точно взвешивают, быстро прибавляют около 1 мл кислоты муравьиной безводной и снова взвешивают. Прибавляют 50 мл *воды Р* и титруют *1 М раствором натрия гидроксида,* используя в качестве индикатора 0,5 мл *раствора фенолфталеина Р.*

1 мл *1 М раствора натрия гидроксида* соответствует 46,03 мг CH_2O_2.

Мышьяка (III) оксид. As_2O_3. *(М.м.* 197,8). *1008300.* [1327-53-3]. Мышьяковистый ангидрид. Димышьяка триоксид.

Кристаллический порошок или белая масса. Мало растворим в воде, растворим в кипящей воде.

Натрий. Na. *(А.м.* 22,99). *1078500.* [7440-23-5].

Металл, на свежем срезе имеет блестящую серебристо-серую поверхность. На воздухе быстро тускнеет и полностью окисляется до натрия оксида, который превращается в натрия карбонат. Бурно реагирует с водой с образованием водорода и натрия гидроксида; растворим в безводном метаноле с образованием водорода и натрия метилата; практически нерастворим в эфире и петролейном эфире.

Хранят в петролейном эфире или жидком парафине (например, керосин).

Натрия азид. NaN_3. (*М.м.* 65,0). *1078900.* [26628-22-8].

Кристаллический порошок или кристаллы белого цвета. Легко растворим в воде, мало растворим в 96% спирте, практически нерастворим в эфире.

Натрия арсенита раствор. *1008301.*

0,50 г *мышьяка (III) оксида Р* растворяют в 5 мл *раствора натрия гидроксида разведенного Р,* прибавляют 2,0 г *натрия гидрокарбоната Р* и доводят объём раствора *водой Р до* 100,0 мл.

Натрия аскорбата раствор. *1078800.* [134-03-2].

3,5 г *кислоты аскорбиновой Р* растворяют в 20 мл *1 М раствора натрия гидроксида.*

Готовят непосредственно перед использованием.

Натрия ацетат. $C_2H_3NaO_2 \cdot 3H_2O$. *(М.м.* 136,1).*1078600.* [6131-90-4]. Натрия этаноат тригидрат. Натрия ацетат тригидрат.

Содержит не менеее 99,05 и не более 101,0% $C_2H_3NaO_2$ в пересчете на сухое вещество.

Бесцветные кристаллы. Очень легко растворим в воде, растворим в 96% спирте.

Потеря в массе при высушивании (2.2.32). От 39,0% до 40,5%. 1,000 г субстанции сушат при температуре 130°С. Субстанцию помещают в холодный сушильный шкаф.

Хранят в воздухонепроницаемом контейнере.

Натрия ацетат безводный. $C_2H_3NaO_2$. *(М.м.* 82,0). *1078700.* [127-09-3].

Бесцветные кристаллы или гранулы. Очень легко растворим в воде, умеренно растворим в 96% спирте.

Потеря в массе при высушивании (2.2.32). Не более 2,0%. Определение проводят при температуреот100°Сдо105°С.

Натрия бензоат. $C_7H_5NaO_2$. (*М.м.* 144,1).Натрия бензолкарбоксикислат.

Содержит не менее 99,0% и не более 100,5% $C_7H_5NaO_2$ в пересчете на сухое вещество.

Кристаллический или гранулированный порошок или пластинки белого цвета. Слабо гигроскопичен. Легко растворим в воде, умеренно растворим в спирте 90% (*об/об*).

Натрия бикарбонат. См. *Натрия гидрокарбонат.*

Натрия бисульфит. См. *Натрия гидросульфит.*

Натрия бутансульфонат. $C_4H_9NaO_3S$. *(М.м.* 160,2). *1115600.* [2386-54-1].

Кристаллический порошок белого цвета. Растворим в воде.

Температура плавления: более 300°С.

Натрия висмутат. $NaBiO_3$. *(М.м.* 280,0). *1079000.* [12232-99-4].

Содержит не менее 85,0% $NaBiO_3$.

Порошок жёлтого или желтовато-коричневого цвета. Медленно разлагается под действием влаги или высокой температуры, практически нерастворим в холодной воде.

Количественное определение. 0,200 г суспендируют в 10 мл раствора 200 г/л *калия йодида Р,* прибавляют 20 мл *кислоты серной разведенной Р и* титруют *0,1 М раствором натрия тиосульфата* до оранжевого окрашивания, используя в качестве индикатора 1 мл *раствора крахмала Р.*

1 мл *0,1 М раствора натрия тиосульфата* соответствует 14,00 мг $NaBiO_3$.

Натрия вольфрамат. $Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$. *(М.м.* 329,9). *1084700.* [10213-10-2]. Динатрия вольфрамат дигидрат.

Кристаллический порошок белого цвета или бесцветные кристаллы. Легко растворим в воде с образованием прозрачного раствора, практически нерастворим в 96% спирте.

Натрия гексансульфонат. $C_6H_{13}NaO_3S$. *(М.м.* 188,2). *1081200.* [2832-45-3].

Порошок белого или почти белого цвета. Легко растворим в воде.

Натрия гептансульфонат. $C_7H_{15}NaO_3S$. *(М.м.* 202,3). *1081000.* [22767-50-6].

Кристаллическая масса белого или почти белого цвета. Легко растворим в воде, растворим в метаноле.

Натрия гептансульфонат моногидрат. $C_7H_{15}NaO_3S \cdot H_2O$. *(М.м.* 220,3). *1081100.*

Содержит не менее 96% $C_7H_{15}NaO_3S$, в пересчёте на безводное вещество.

Кристаллический порошок белого цвета. Растворим в воде, очень мало растворим в этаноле, практически нерастворим в эфире.

Вода (2.5.12). Не более 8%. Определение проводят из 0,300 г.

Количественное определение. 0,150 г растворяют в 50 мл *кислоты уксусной безводной Р* и титруют *0,1 М раствором кислоты хлорной* потенциометрически *(2.2.20).*

1 мл *0,1М раствора кислоты хлорной* соответствует 20,22 мг $C_7H_{15}NaO_3S$.

Натрия гидрокарбонат. $NaHCO_3$. *(М.м.* 84,0). *1081300.* [144-55-8]. Натрия бикарбонат.

Содержит не менее 99,0% и не более 101,0% $NaHCO_3$.

Кристаллический порошок белого цвета. Растворим в воде, практически нерастворим в 96% спирте.

Натрия гидрокарбоната раствор. *1081301.* Раствор 42 г/л.

Натрия гидроксид. NaOH. *(М.м.* 40,0). *1081400.* [1310-73-2].

Содержит не менее 97,0% и не более 100,5% суммы щелочей, в пересчете на NaOH.

Кристаллическая масса белого цвета в виде гранул, палочек или пластинок. Расплывается на воздухе, легкопоглощает углерода диоксид из воздуха. Очень легко растворим в воде, легко растворим в 96% спирте.

Количественное определение. 2,000 г субстанции растворяют в 80 мл *воды, свободной от углерода диоксида, Р*, прибавляют 0,3 мл *раствора фенолфталеина Р* и титруют *1 М раствором кислоты хлористоводородной*. Затем прибавляют 0,3 мл *раствора метилового оранжевого Р* и продолжают титрование *1 М раствором кислоты хлористоводородной.*

1 мл *1 М раствора кислоты хлористоводородной*, пошедшедший на титрование во второй части титрования, соответствует 0,1060 г Na_2CO_3.

1 мл *1М раствора кислоты хлористоводородной*, пошедший на титрование от начала до конца титрования, соответствует 40,00 мг суммы щелочей, в пересчете на NaOH.

Хранят в воздухонепроницаемом неметаллическом контейнере.

Натрия гидроксида раствор. *1081401.*

20,0 г *натрия гидроксида Р* растворяют в *воде Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл. Концентрацию раствора определяют титрованием 1 *М раствором кислоты хлористоводородной,* используя в качестве *индикатора раствор метилового оранжевого Р;* если необходимо, раствор укрепляют или разбавляют до концентрации 200 г/л.

Натрия гидроксида раствор разведенный. *1081402.*

8,5 г *натрия гидроксида Р* растворяют в *воде Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 100 мл.

Натрия гидроксида метанольный раствор. *1081403.*

40 мг *натрия гидроксида* Р растворяют в 50 мл *воды Р,* полученный раствор охлаждают и прибавляют 50 мл *метанола Р.*

Натрия гидроксида раствор концентрированный. ***1081404.***

42 г *натрия гидроксида Р* растворяют в *воде Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 100 мл.

Натрия гидросульфит. $NaHO_3S$. *(М.м.* 104,1). *1115700.* [7631-90-5]. Натрия бисульфит.

Кристаллический порошок белого цвета. Легко растворим в воде, умеренно растворим в 96% спирте.

На воздухе частично теряет серы диоксид и постепенно окисляется до сульфата.

Натрия гипобромита раствор. *1081500.*

20 мл *раствора натрия гидроксида концентрированного Р и* 500 мл *воды Р* смешивают на ледяной бане, прибавляют 5 мл *раствора брома Р* и осторожно перемешивают до растворения.

Готовят непосредственно перед использованием.

Натрия гипофосфит. $NaH_2PO_2 \cdot H_2O$. *(М.м.* 106,0). *1081700.* [10039-56-2]. Натрия фосфинат моногидрат.

Кристаллический порошок белого цвета или бесцветные кристаллы. Гигроскопичен, легко растворим в воде, растворим в 96% спирте.

Хранят в воздухонепроницаемом контейнере.

Натрия гипофосфита раствор. Реактив Тиле. 20 г *натрия гипофосфита Р* растворяют в 40 мл *воды Р*. Раствор вливают в 180 мл *кислоты хлористоводородной Р* и оставляют на 24 ч. По осаждении выделившихся кристаллов натрия хлорида жидкость сливают с осадка. Раствор должен быть бесцветным. Хранят в стеклянном контейнере с притертой пробкой.

Натрия гипохлорита раствор концентрированный. *1081600.*

Содержит не менее 25 г/л и не более 30 г/л активного хлора.

Жидкость желтоватого цвета, имеет щелочную реакцию.

Количественное определение. В колбу с 50 мл *воды Р* последовательно помещают 1 г *калия йодида Р* и 12,5 мл *кислоты уксусной разведенной Р.* 10,0 мл концентрированного раствора натрия гипохлорита доводят *водой Р* до объёма 100,0

мл. 10.0 мл полученного раствора помещают в колбу с реактивами и титруют *0.1 М раствором натрия тиосульфата,* используя в качестве индикатора 1 *мл раствора крахмала Р.*

1 мл 0,1 М раствора натрия тиосульфата соответствует 3,546 мг активного хлора.

Хранят в защищённом от света месте.

Натрия глюкуронат. $C_6H_9NaO_7 \cdot H_20$. *(М.м.* 234,1). *1080900.* Натрия D-глюкуронат моногидрат.

$[a]_D^{20}$: около +21,5°. Определение проводят, используя раствор 20 г/л.

Натрия декансульфонат. $C_{10}H_{21}NaO_3S$. *(М.м.* 244,3). *1079800.* [13419-61-9].

Кристаллический порошок или хлопья белого или почти белого цвета. Легко растворим в воде, растворим в метаноле.

Натрия дезоксирибонуклеат. *1079900.* [73049-39-5]. (Около 85% имеет молекулярную массу $2 \cdot 10^7$ или более).

Волокнистое вещество белого цвета; получают из тимуса телёнка.

Испытание на пригодность. 10 мг растворяют в *имидазолъном буферном растворе рН 6,5 Р* и доводят объём раствора тем же буферным раствором до 10,0 мл (раствор А). 2,0 мл раствора А доводят *имидазольным буферным раствором рН 6,5 Р но* объёма 50,0 мл. Оптическая плотность *(2.2.25)* полученного раствора, измеренная при длине волны 260 нм, должна быть от 0,4 до 0,8.

К 0,5 мл раствора А прибавляют 0,5 мл *имидазольного буферного раствора рН 6,5 Р,* 3 мл раствора 25 г/л ($HClO_4$) кислоты хлорной, образуется осадок, который центрифугируют. Измеряют оптическую плотность надосадочной жидкости при длине волны 260 нм, используя в качестве компенсационной жидкости смесь, состоящую из 1 мл *имидазольного буферного раствора рН 6,5 Р* и 3 мл раствора 25 г/л ($HClO_4$) кислоты хлорной. Оптическая плотность должна быть не более 0,3.

В каждую из двух пробирок помещают по 0,5 мл раствора А и 0,5 мл раствора сравнения стрептодорназы, содержащего 10 МЕ/мл, в *имидазолъном буферном растворе рН 6,5 Р.* В одну пробирку тотчас прибавляют 3 мл раствора 25 г/л ($HClO_4$) кислоты хлорной, образуется осадок, который центрифугируют и собирают надосадочную жидкость (а). Другую пробирку нагревают при температуре 37°С в течение 15 мин, прибавляют 3 мл раствора 25 г/л ($HClO_4$) кислоты хлорной, центрифугируют и собирают надосадочную жидкость (b). Измеряют оптическую плотность надосадочной жидкости (b) при длине волны 260 нм, используя в качестве компенсационного раствора надосадочную жидкость (а). Оптическая плотность должна быть не менее 0,15.

Натрия дезоксихолат. $C_{24}H_{39}NaO_4$. *(М.м.* 414,6). *1131800*. [302-95-4]. Натрий 3a ,12a -дигидрокси-5b холан-24-оат.

Натрия дигидрофосфат. $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$. *(М.м.* 156,0). *1080100.* [10028-24-7]. Натрия дигидрофосфат дигидрат.

Содержит не менее 98,0% и не более 100,5% NaH_2PO_4 в пересчете на сухое вещество.

Порошок белого цвета или бесцветные кристаллы. Очень легко растворим в воде, очень мало растворим в 96% спирте.

Потеря в массе при высушивании (2.2.32). От 21,5% до 24,0%. 0,50 г субстанции сушат при температуре 130°С.

Хранят в плотно укупоренном контейнере.

Натрия дигидрофосфат безводный. NaH_2PO_4. *(М.м.* 120,0). *1080200.* [7558-80-7].

Порошок белого цвета, гигроскопичен.

Хранят в воздухонепроницаемом контейнере.

Натрия дигидрофосфат моногидрат. NaH_2PO_4,H_2O.*(М.м.* 138,0). *1080300.* [10049-21-5].

Кристаллы или гранулы белого цвета, слегка расплывающиеся на воздухе. Легко растворим в воде, практически нерастворим в 96% спирте.
Хранят в воздухонепроницаемом контейнере.

Натрия дитионит. $Na_2S_2O_4$. *(М.м.* 174,1). *1080400.* [7775-14-6].

Кристаллический порошок белого или сероватобелого цвета; на воздухе окисляется. Очень легко растворим в воде, мало растворим в 96% спирте.

Хранят в воздухонепроницаемом контейнере.

Натрия диэтилдитиокарбамат. $C_5H_{10}NNaS_2 \cdot 3H_20$. *(М.м.* 225,3). *1080000.* [20624-25-3].

Бесцветные или белого цвета кристаллы. Легко растворим в воде, растворим в 96% спирте. Водный раствор бесцветный.

Натрия додецилсульфат. *1080500.* [151-21-3]. См. *Натрия лаурилсульфат* за исключением содержания, которое должно быть не менее 99.0*%.*

Буферный рабочий раствор для электрофореза в системе натрия додецилсульфат-полиакриламидный гель (SDS-PAGE). *1114900.*

151,4 г *трис(гидроксиметил)аминометана Р,* 721,0 г *глицина Р* и 50,0 г *натрия лаурилсульфата Р* растворяют в *воде Р* и доводят тем же растворителем до объёма 5000 мл. Непосредственно перед использованием, разводят водом *Р* в 10 раз и перемешивают.

pH (2.2.3) полученного раствора должен быть от 8,1 до 8,8.

Буферный образцовый раствор (концентрированный) для электрофореза в системе натрия додецилсульфат - полиакриламидный гель (SDS-PAGE). *1115000.*

1,89 г *трис(гидроксиметил)аминометана Р,* 5,0 г *натрия лаурилсульфата Р,* 50 мг *бромфенолового синего* Р и 25,0 мл *глицерина* Р растворяют в 100 мл воды *Р.* Доводят pH раствора до 6,8 *кислотой хлористоводородной Р и* доводят *водой Р до* объёма 125 мл.

Буферный образцовый раствор (концентрированный) для электрофореза в системе натрия додецилсульфат - полиакриламидный гель (SDS-PAGE) для восстановительных условий. *1122100.*

3,78 г *трис(гидроксиметил)аминометана Р*, 10,0 г *натрия додецилсульфата Р*, 100 мг *бромфенолового синего Р* и 50,0 мл *глицерина Р* растворяют в 200 мл *воды Р*. К полученному раствору прибавляют 25,0 мл *2-меркаптоэтанола Р*, доводят pH (2.2.3) раствора до 6,8 *кислотой хлористоводородной Р* и доводят *водо Р* до объёма 250,0 мл.

Альтернативно в качестве восстанавливающего вещества вместо 2-меркаптоэтанола может быть использован дитиотреитол. В этом случае образцовый буферный раствор готовят следующим образом: 3,78 г *трис(гидроксиметил)аминометана Р,* 10,0 г *натрия додецилсульфата Р,* 100 мг *бромфенолового синего Р и* 50,0 мл *глицерина Р* растворяют в 200 мл *воды Р.* Доводят pH *(2.2.3)* раствора до 6,8 *кислотой хлористоводородной Р* и разводят *водой Р* до объёма 250,0 мл. Непосредственно перед использованием прибавляют *дитиотреитол Р до* конечной концентрации 100 мМ.

Натрия йодид. NaI. *(М.м.* 149,9). *1081800.* [7681-82-5].

Кристаллический порошок белого цвета или бесцветные кристаллы. Гигроскопичен. Очень легко растворим в воде, легко растворим в 96% спирте.

Потеря в массе при высушивании (2.2.32). Не более 3,0%. 1,00 г субстанции сушат при температуре от 100°С до 105°С продолжительностью 3 ч.

Хранят в защищенном от света месте.

Натрия карбонат. $Na_2CO_3 \cdot 10H_2O$. *(М.м.* 286,1). *1079200.* [6132-02-1]. Натрия карбоната декагидрат.

Содержит не менее 36,7% и не более 40,0% Na_2CO_3.

Кристаллический порошок белого цвета или бесцветные, прозрачные кристаллы. Выветриваются на воздухе. Легко растворим в воде, практически нерастворим в 96% спирте.

Хранят в воздухонепроницаемом контейнере.

Натрия карбонат моногидрат. $Na_2CO_3 \cdot H_2O$ *(М.м.* 124,0).

Содержит не менее 83,0% и не более 87,5% Na_2CO_3.

Белый кристаллический порошок или бсцветные кристаллы. Легко растворим в воде, практически нерастворим в 96% спирте.

Хранят в плотно укупоренном контейнере.

Натрия карбонат безводный. Na_2CO_3. *(М.м.* 106,0). *1079300.* [497-19-8]. Динатрия карбонат.

Порошок белого цвета, гигроскопичен. Легко растворим в воде.

Потеря в массе при высушивании при температуре около 300°C должна быть не более 1%.

Хранят в воздухонепроницаемом контейнере.

Натрия карбоната раствор. *1079301.*

Раствор 106 г/л *натрия карбоната безводного Р.*

Натрия карбоната раствор Р1. *1079302.*

Раствор 20 г/л *натрия карбоната безводного Р в 0,1 М растворе натрия гидроксида.*

Натрия кобальтинитрит. $Na_3[Co(NO_2)_6]$. *(М.м.* 403,9). *1079700.* [13600-98-1]. Тринатрия гексанитрокобальтат (III).

Порошок оранжево-жёлтого цвета. Легко растворим в воде, мало растворим в 96% спирте.

Натрия кобальтинитрита раствор. *1079701.* Раствор 100 г/л.

Готовят непосредственно перед использованием.

Натрия лаурилсульфат. *1081900.* [151-21-3].Натрия додецилсульфат.

Натрия лаурилсульфат представляет собой смесь натрия алкилсульфатов, образующихся, в основном, с натрия додецилсульфата ($C_{12}H_{25}NaO_4S$, *М.м.* 288,4).

Субстанция содержит не менее 85% натрия алкилсульфатов, в пересчете на $C_{12}H_{25}NaO_4S$.

Порошок или кристаллы белого или бледно-желтого цвета. Легко растворим в воде с получение мутноватого раствора, частично растворим в 96% спирте.

Натрия метабисульфит. $Na_2S_2O_5$. *(М.м.* 190,1). *1082000.* [7681-57-4]. Натрия дисульфит.
Содержит не менее 95,0% и не более 100,5% $Na_2S_2O_5$.
Кристаллический порошок белого цвета или почти белого цвета или бесцветные кристаллы. Легко растворим в воде, мало растворим в 96% спирте.
Хранят в плотно укупоренном контейнере, в защищенном от света месте.

Натрия метансульфонат. CH_3SO_3Na. *(М.м.* 118,1). *1082100.* [2386-57-4].

Кристаллический порошок белого цвета, гигроскопичен.

Хранят в воздухонепроницаемом контейнере.

Натрия молибдат. $Na_2MoO_4{\cdot}2H_2O$. *(М.м.* 242,0). *1082200.* [10102-40-6]. Динатрия молибдат дигидрат.

Кристаллический порошок белого цвета или бесцветные кристаллы. Легко растворим в воде.

Натрия нафтохинонсульфонат. $C_{10}H_5NaO_5S$. *(М.м.* 260,2). *1082300.* [521-24-4]. Натрия 1,2-нафтохинон-4-сульфонат.

Кристаллический порошок от жёлтого до оранжево-жёлтого цвета. Легко растворим в воде, практически нерастворим в 96% спирте.

Натрия нитрат. $NaNO_3$. *(М.м.* 85,0). *1082400.* [7631-99-4].

Порошок или гранулы белого цвета или бесцветные, прозрачные кристаллы, расплывающиеся на воздухе. Легко растворим в воде, мало растворим в 96% спирте.

Хранят в воздухонепроницаемом контейнере.

Натрия нитрит. $NaNO_2$. *(М.м.* 69,0). *1082500.* [7632-00-0].

Содержит не менее 97,0% $NaNO_2$.

Гранулированный порошок белого цвета или кристаллический порошок слегка желтоватого цвета. Легко растворим в воде.

Натрия нитрита раствор. *1082501.*

Раствор 100 г/л.

Готовят непосредственно перед использованием.

Натрия нитропруссид. $Na_2[Fe(CN)_5(NO)]{\cdot}2H_2O$. *(М.м.* 298,0). *1082600.* [13755-38-9]. Натрия пентацианонитрозилферрат (III) дигидрат.

Порошок или кристаллы красновато-коричневого цвета. Легко растворим в воде, мало растворим в 96% спирте.

Натрия нитропруссида окисленного раствор. 10 г *натрия нитропруссида Р* растворяют в 100 мл *воды Р*, прибавляют 5 мл раствора 1:30 *калия перманганата Р* и 2 мл раствора 100 г/л *натрия гидроксида Р*. Полученную смесь фильтруют и выдерживают в течение 24 ч. Срок годности раствора 2 мес.

Натрия оксалат. $C_2Na_2O_4$. *(М.м.* 134,0). *1082900.* [62-76-0].

Кристаллический порошок белого цвета. Растворим в воде, практически нерастворим в 96% спирте и эфире.

Натрия октансульфонат. $C_8H_{17}NaO_3S$. *(М.м.* 216,3). *1082700.* [5324-84-5].

Содержит не менее 98,0% $C_8H_{17}NaO_3S$.

Кристаллический порошок или хлопья белого или почти белого цвета. Легко растворим в воде, растворим в метаноле.

Оптическая плотность (2.2.25). Оптическая плотность раствора 54 г/л при длине волны 200 нм должна быть не более 0,10, а при длине волны 250 нм - не более 0,01.

Натрия октилсульфат. $C_8H_{17}NaO_4S$. *(М.м.* 232,3). *1082800.* [142-31-4].

Кристаллический порошок или хлопья белого или почти белого цвета. Легко растворим в воде, растворим в метаноле.

Натрия пентансульфонат. $C_5H_{11}NaO_3S$. *(М.м.* 174,2). *1083000.* [22767-49-3].

Твердое кристаллическое вещество белого цвета. Растворим в воде.

Натрия перйодат. $NaIO_4$ *(М.м.* 213,9). *1083200.* [7790-28-5]. Натрия метаперйодат.

Содержит не менее 99,0% $NaIO_4$.

Кристаллический порошок или кристаллы белого цвета. Растворим в воде и минеральных кислотах.

Натрия перйодата раствор. *1083201.*

1,07 г *натрия перйодата Р* растворяют в *воде Р,* прибавляют 5 мл *кислоты серной разведенной Р* и доводят объём раствора *водой Р* до 100,0 мл.

Готовят непосредственно перед использованием.

Натрия перхлорат. $NaClO_4{\cdot}H_20$. *(М.м.* 140,5). *1083100.* [7791-07-3].

Содержит не менее 99,0% $NaClO_4,H_2O$.

Кристаллы белого цвета, расплывающиеся на воздухе. Очень легко растворим в воде.

Хранят в плотно закрытом контейнере.

Натрия пикрата щелочной раствор. *1083300.*

Смешивают 20 *мл раствора кислоты пикриновой Р* и 10 мл раствора 50 г/л *натрия гидроксида Р,* доводят объём раствора *водой* Р до 100 мл.

Срок годности 2 сут с момента приготовления.

Натрия пирофосфат. $Na_4P_2O_7{\cdot}10H_2O$. *(М.м.* 446,1). *1083600.* [13472-36-1].

Тетранатрия дифосфат декагидрат.

Бесцветные, слегка выветривающиеся кристаллы. Легко растворим в воде.

Натрия родизонат. $C_6Na_2O_6$. *(М.м.* 214,0). *1122300.* [523-21-7].

[(3,4,5,6-тетраоксоциклогекс-1-ен-1,2-илен)диокси]динатрий.

Кристаллы фиолетового цвета. Растворим в воде с образованием оранжево-жёлтого раствора. Растворы нестабильны, их готовят в день использования.

Натрия салицилат. $C_7H_5NaO_3$. *(М.м.* 160,1). *1083700.* [54-21-7].

Натрия 2-гидроксибензолкарбоксилат.

Кристаллический порошок белого цвета или мелкие бесцветные кристаллы или блестящие пластины. Легко растворим в воде, умеренно растворим в 96% спирте.

Содержит не менее 99,0% и не более 101,0% $C_7H_5NaO_3$ в пересчете на сухое вещество.

Хранят в воздухонепроницаемом контейнере, в защищенном от света месте.

Натрия сульфат безводный. Na_2SO_4. *(М.м.* 142,0). *1083800.* [7757-82-6].

Содержит не менее 98,5% и не более 101,0% Na_2SO_4 в пересчете на сухое вещество.

Порошок белого цвета. Гигроскопичен. Легко растворим в воде.

Потеря в массе при высушивании (2.2.32). Не более 0.5%. Опредение проводят при температуре 130°С.

Хранят в воздухонепроницаемом контейнере.

Натрия сульфат. $Na_2SO_4 \cdot 10H_2O$. *(М.м.* 322,2). Натрия сульфат декагидрат.

Содержит не менее 98,5% и не более 101,0% Na_2SO_4 в пересчете на сухое вещество.

Кристаллический порошок белого цвета или бесцветные прозрачные кристаллы. Выветривается на воздухе. Легко растворим в воде, практически нерастворим в да% спирте. Частично растворяется в кристаллизационной воде при температуре около 33°С.

Потеря в массе при высушивании (*2.2.32*). От 52,0% до 57,0%. 1,000 г субстанции сушат при температуре 30°С продолжительностью 1 ч, затем при температуре 130°С.

Натрия сульфид. $Na_2S \cdot 9H_2O$. *(М.м.* 240,2). *1083900.* [1313-84-4]. Динатрия сульфид нонагидрат.

Бесцветные, быстро желтеющие кристаллы, расплывающиеся на воздухе. Очень легко растворим в воде.

Хранят в воздухонепроницаемом контейнере.

Натрия сульфида раствор. *1083901.*

12 г *натрия сульфида Р* растворяют при нагревании в 45 мл смеси растворителей *вода Р -глицерин (85%) Р* (10:29), затем охлаждают и доводят объём раствора той же смесью растворителей до 100 мл.

Раствор должен быть бесцветным.

Натрия сульфит. $Na_2SO_3 \cdot 7H_2O$. *(М.м.* 252,2). *1084000.* [27610-45-3]. Натрия сульфит гептагидрат.

Содержит не менее 48,0% и не более 52,5% Na_2SO_3.

Бесцветные кристаллы. Легко растворим в воде, очень мало растворим в 96% спирте.

Натрия сульфит безводный. Na_2SO_3. *(М.м.* 126,0). *1084100.* [7757-83-7].

Содержит не менее 95,0% и не более 100,5% Na_2SO_3.

Порошок белого цвета. Легко растворим в воде, очень мало растворим в 96% спирте.

Хранят в воздухонепроницаемом контейнере.

Натрия тартрат. $C_4H_4Na_2O_6 \cdot 2H_2O$. *(М.м.* 230,1). *1084200.* [6106-24-7]. Динатрия (2R,3R)-2,3-дигидроксибутандиоат дигидрат.

Кристаллы или гранулы белого цвета. Очень легко растворим в воде, практически нерастворим в 96% спирте.

Натрия тетрадейтеродиметилсилапентаноат. $C_6H_9{}^2H_4Na0_2Si$. *(М.м.* 172,3). *084300.* TSP. Натрия (2,2,3,3-тетрадейтеро)-4,4-диметил-4-сила-пентаноат.

Степень дейтерирования не менее 99%.

Кристаллический порошок белого цвета. Легко растворим в воде, этаноле и метаноле.

Температура плавления: около 300°С.

Вода и дейтерия оксид: не более 0,5%.

Натрия тетрафенилборат. $NaB(C_6H_5)_4$. *(М.м.* 342,2). *1084400.* [143-66-8].

Объёмный порошок белого или слегка желтоватого цвета. Легко растворим в воде и ацетоне.

Натрия тетрафенилбората раствор. *1084401.* Раствор 10 г/л. Если необходимо, перед использованием фильтруют.

Срок годности 7 сут.

Натрия тиогликолят. $C_2H_3Na0_2S$. *(М.м.* 114,1). *1084500.* [367-51-1]. Натрия меркаптоацетат.

Гранулированный порошок или кристаллы белого цвета. Гигроскопичен, легко растворим в воде и метаноле, мало растворим в 96% спирте.

Хранят в воздухонепроницаемом контейнере.

Натрия тиосульфат. $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$. *(М.м.* 248,2). *1084600.* [10102-17-7].

Кристаллы бесцветные, прозрачные. Выветриваются на сухом воздухе. Очень легко растворим в воде, практически нерастворим в 96% спирте. Растворяется в кристаллизационной воде при температуре около 49°С.

Содержит не менее 99,0% и не более 101,0% $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$.

Хранят в воздухонепроницаемом контейнере.

Натрия флуоресцеинат. $C_{20}H_{10}Na_2O_5$. *(М.м.* 376,3). *1080700.* [518-47-8]. Показатель Шульца №880. Цветной индекс №45350. Флуоресцеин натрия.

Динатрия 2-(3-оксо-6-оксидо-3Н-ксантен-9-ил)бензоат.
Порошок оранжево-красного цвета. Легко растворим в воде. Водные растворы имеют интенсивную желтовато-зелёную флуоресценцию.

Натрия формиат. $CHNaO_2$. *(М.м.* 68,0). *1122200.* [141-53-7].

Кристаллический порошок или расплывающиеся гранулы белого цвета. Растворим в воде и глицерине, мало растворим в 96% спирте.
Температура плавления: около 253°С.

Натрия фосфат додекагидрат. $Na_3PO_4 \cdot 12H_2O$. *(М.м.* 380,1). *1094300.* [10101-89-0]. Тринатрия фосфат додекагидрат.

Бесцветные или белого цвета кристаллы. Легко растворим в воде.

Натрия фторид. NaF. *(М.м.* 41,99). *1080800.* [*7681-49-4*].

Содержит не менее 98,5% и не более 100,5% NaF в пересчете на сухое вещество.

Порошок белого цвета или бесцветные кристаллы. Растворим в воде, практически нерастворим в 96% спирте.

Потеря в массе при высушивании (2.2.32). Не более 0,5%. Определение проводят из 1,000 г субстанции, высушенной при температуре 130°С в течение 3 ч.

Натрия хлорид. NaCl. *(М.м.* 58,44). *1079500.* [7647-14-5].

Кристаллический порошок белого цвета, бесцветные кристаллы или белые крупинки. Легко растворим в воде, практически нерастворим в этаноле.

Содержит не менее 99,0% и не более 100,5% NaCl в пересчете на сухое вещество.

Натрия хлорида раствор. *1079502.*

Раствор 20 *% (м/м).*

Натрия хлорида насыщенный раствор. *1079503.*

1 часть *натрия хлорида Р* смешивают с 2 частями *воды Р,* периодически встряхивают и отстаивают. Перед использованием раствор декантируют и фильтруют, если необходимо.

Натрия цетостеарилсульфат. *1079400.*

Аморфный или кристаллический порошок белого или бледно-желтого цвета. Растворим в горячей воде с образованием опалесцирующего раствора, практически нерастворим в холодной воде, частично растворим в 96% спирте.

Натрия цетостеарилсульфат – смесь натрия цетилсульфата ($C_{16}H_{33}NaO_4S$, *М.м.* 344,5) и натрия стеарилсульфата ($C_{18}H_{37}NaO_4S$, *М.м.* 372,5). Содержит не менее 90,0% натрия цетостеарилсульфата и не менее 40,0% натрия цетилсульфата – оба в пересчете на сухое вещество. Может прилагаться подходящий буферный раствор.

Натрия цитрат. $C_6H_5Na_3O_5·2H_2O$. *(М.м.* 294,1). *1079600.* [6132-04-3]. Тринатрия 2-гидроксипропан-1,2,3-трикарбоксилат.

Содержит не менее 99,0% и не более 101,0% $C_6H_5Na_3O_5$·в пересчете на безводное вещество.

Кристаллический порошок или гранулированные кристаллы белого цвета, слегка расплываются во влажном воздухе. Легко растворим в воде, практически нерастворим в 96% спирте.

Вода (2.5.12). От 11,0% до 13,0%. Определение проводят из 0,300 г субстанции полумикрометодом. После прибавления субстанции перед титрованием раствор перемешивают в течение 15 мин.

Хранят в воздухонепроницаемом контейнере.

Натрия эдетат. $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8·2H_2O$. *(М.м.* 372,2). *1080600.* [6381-92-6]. Динатрий дигидроген(этилендинитрил)тетраацетат дигидрат. Трилон Б.

Содержит не менее 98,5% и не более 101,0% $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8·2H_2O$.

Белый кристаллический порошок. Растворим в воде, умеренно растворим в 96% спирте и практически нерастворим в эфире.

Нафталин. $C_{10}H_8$. *(М.м.* 128,2). *1057100.* [91-20-3].

Кристаллы белого цвета. Практически нерастворим в воде, легко растворим в эфире, растворим в 96% спирте.

Температура плавления: около 80°С.

Нафталин, используемый для жидкостной сцинтилляции, должен быть соответствующей степени чистоты.

Нафтарзон. $C_{16}H_{11}AsN_2Na_2O_{10}S_2$. *(М.м.* 576,3). *1121400.* [132-33-2]. Торин. Динатрия4-[(2-арсо-нофенил)азо]-3-гидроксинафталин-2,7-дисульфонат.

Порошок красного цвета. Растворим в воде.

Нафтарзона раствор. *1121401.* Раствор 0.58 г/л.

Испытание на чувствительность. К 50 мл *96% спирта Р* прибавляют 20 мл *воды Р, 1мл 0,05 М раствора кислоты серной,* 1 мл раствора нафтарзона и титруют *0,025 М раствором бария перхлората* до перехода окраски раствора от оранжево-жёлтой к оранжево-розовой.

Хранят в защищённом от света месте. Срок хранения 7 сут.

Нафтиламин. $C_{10}H_9N$. *(М.м.* 143,2). *1057700.* [134-32-7]. 1-Нафтиламин.

Кристаллический порошок белого цвета, под действием света и воздуха розовеет. Мало растворим в воде, легко растворим в 96% спирте и эфире.

Температура плавления: около 51°С.

Хранят в защищённом от света месте.

Нафтилэтилецдиамина дигидрохлорид. $C_{12}H_{16}Cl_2N_2$. *(М.м.* 259,2). *1057800.* [1465-25-4]. N-(1-Нафтил)этилендиамина дигидрохлорид. Может содержать кристаллизационный метанол.

Порошок белого или желтовато-белого цвета. Растворим в воде, мало растворим в 96% спирте.

Нафтилэтилендиамина дигидрохлорида раствор. *1057801.*

0,1 г *нафтилэтилецдиамина дигидрохлорида Р* растворяют в *воде Р* и доводят объем раствора этим же растворителем до 100 мл.

Готовят непосредственно перед использованием.

α-Нафтол. $C_{10}H_80$. *(М.м.* 144,2). *1057300.* [90-15-3]. 1-Нафтол.

Кристаллический порошок белого цвета или бесцветные или белого цвета кристаллы, темнеющие под действием света. Мало растворим в воде, легко растворим в 96% спирте и эфире.

Температура плавления: около 95°С.

Хранят в защищённом от света месте.

α -Нафтола раствор. *1057301.*

0,10 г *α-нафтола Р* растворяют в 3 мл раствора 150 г/л *натрия гидроксида Р* и доводят объём раствора *водой* Р до 100 мл.

Готовят непосредственно перед использованием.

 # α-Нафтола раствор Р1.

2 г *α-нафтола Р* растворяют в 10 мл *96% спирта Р.*

Хранят в защищенном от света месте при температуре от 15°С до 25°С не более 7 сут.

β-Нафтол. $C_{10}H_8O$. (М..м. 144,2). *1057400.* [135-19-3]. 2-Нафтол.

Пластинки или кристаллы белого или слабо-розового цвета. Очень мало растворим в воде, очень легко растворим в 96% спирте.

Температура плавления: около 122°С.

Хранят в защищённом от света месте.

β-Нафтола раствор. *1057401.*

5 г свежеперекристаллизованного *β-нафтола Р* растворяют в 40 мл *раствора натрия гидроксида разведенного Р* и доводят объём раствора *водой* Р до 100 мл. Готовят непосредственно перед использованием.

β-Нафтола раствор Р1. *1057402.*

3,0 мг *β-нафтола* Р растворяют в 50 мл *кислоты серной Р* и доводят объём раствора той же кислотой до 100.0 мл.

Готовят непосредственно перед использованием.

Нафтолбензеин. $C_{27}H_{20}O_3$. *(М.м.* 392,5). *1057600.* [6948-88-5]. *α* -Нафтолбензеин. Фенилбис(4-гидроксинафтил)метанол.

Порошок коричневато-красного цвета или блестящие кристаллы коричневато-черного цвета. Практически нерастворим в воде, растворим в 96% спирте и кислоте уксусной ледяной.

Нафтолбензеина раствор. *1057601.* Раствор 2 г/л в *кислоте уксусной безводной Р.*

Испытание на чувствительность. К 50 мл *кислоты уксусной ледяной Р* прибавляют 0,25 мл раствора нафтолбензеина; появляется коричневато-жёлтое окрашивание, которое должно перейти в зелёное при прибавлении не более 0,05 мл *0,1 М раствора кислоты хлорной.*

Нейтральный красный. $C_{15}H_{16}N_4 \cdot HCl$ (*М.м.* 288,78).

3-амино-7-диметиламино-2-метилфеназина гидрохлорид.

Кристаллы или порошок черного или черно-зеленого цвета. Легко растворим в воде.

Нейтральный красный раствор.

0,1 г *нейтрального красного Р* растворяют в *воде Р* и доводят объем раствора этим же растворителем до 100 мл.

Нерилацетат. $C_{12}H_{20}0_2$. *(М.м.* 196,3). *1108000.* [141-12-8].

(Z)-3,7-Диметилокта-2,6-диенилацетат.

Бесцветная, маслянистая жидкость.

d_{20}^{20}: около 0,907.

n_D^{20}: около 1,460.

Температура $кипения_{25}$: 134°С.

Нерилацетат, используемый в газовой хроматографии, должен выдерживать следующее дополнительное испытание.

Количественное определение. Проводят методом газовой хроматографии *(2.2.28),* как указано в статье *Масло цветков померанца,* используя нерилацетат в качестве испытуемого раствора.

Площадь основного пика должна быть не менее 93,0% суммы площадей всех пиков.

транс-Неролидол. $C_{15}H_{26}O$. *(М.м.* 222,4). *1107900.* [40716-66-3].

3,7,11 -Триметилдодека-1,6,10-триен-3-ол.

Жидкость слабо-жёлтого цвета с легким запахом лилии или ландыша. Практически нерастворим в воде и глицерине, смешивается с 96% спиртом.

d_{20}^{20} : около 0,876.

n_D^{20} : около 1,479.

Температура кипения$_{12}$: от 145°C до 146°C.

транс- Неролидол, используемый в газовой хроматографии, должен выдерживать следующее дополнительное испытание.

Количественное определение. Проводят методом газовой хроматографии *(2.2.28),* как указано в статье *Масло цветков померанца,* используя *транс*неролидол в качестве испытуемого раствора.

Площадь основного пика должна быть не менее 90,0% суммы площадей всех пиков.

Несслера реактив. См. *Калия тетрайодомеркурата щелочной раствор.*

Никель-алюминиевый сплав. *1058100.*

Содержит от 48% до 52% алюминия *(Al, А.м.* 26,98) и от 48% до 52% никеля (Ni, *А.М.* 58,70).

Перед использованием измельчают до мелкого порошка (180).

Практически не растворим в воде, растворим в минеральных кислотах.

Никель-алюминиевый сплав, свободный от галогенов. *1118100.*

Содержит от 48% до 52% алюминия *(Al, А.м.* 26,98) и от 48% до 52% никеля (Ni, *А.М.* 58,70).

Мелкий порошок серого цвета. Практически нерастворим в воде, растворим в минеральных кислотах с образованием солей.

Хлориды. Не более 0,001% (10 ppm). 2,00 г растворяют в 40 мл *кислоты азотной Р,* раствор упаривают почти досуха. Остаток растворяют в *воде Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 20,0 мл. Раствор разливают поровну в две пробирки. В каждую пробирку прибавляют по 1,0 мл *0,1 М раствора серебра нитрата* и через 15 мин фильтруют. К полученному фильтрату одной пробирки прибавляют 0,25 мл раствора 40 мкг/мл (Cl) натрия хлорида (эталонный раствор). Через 5 мин сравнивают опалесценцию испытуемого раствора с эталонным раствором. Испытуемый раствор должен выдерживать испытание на хлориды.

Никеля сульфат. $NiSO_4 \cdot 7H_2O$ *(М.м.* 280,9). *1058000.* [10101-98-1]. Никеля сульфат гептагидрат.

Кристаллический порошок или кристаллы зелёного цвета. Легко растворим в воде, мало растворим в 96% спирте.

Никеля хлорид. $NiCl_2$. *(М.м.* 129,6). *1057900.* [7718-54-9]. Никеля хлорид безводный.

Кристаллический порошок жёлтого цвета. Очень легко растворим в воде, растворим в 96% спирте. Сублимируется в отсутствие воздуха и легко абсорбирует аммиак. Водный раствор имеет кислую реакцию.

Никотинамид-аденина динуклеотид. $C_{21}H_{27}N_7O_{14}P_2$. *(М.м.* 663). *1108100.* [53-84-9]. NAD^+.

Порошок белого цвета, сильно гигроскопичен. Легко растворим в воде.

Никотинамид-аденина динуклеотида раствор. *1108101.*

40 мг *никотинамид-аденина динуклеотида Р* растворяют в *воде Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 10 мл.

Готовят непосредственно перед использованием.

Нильский синий А. $C_{20}H_{21}N_3O_5S$. (*М.м.* 415,5). *1058200.* [3625-57-8]. Показатель Шульца №1029. Цветной индекс №51180.

5-Амино-9-(диэтила-мино)бензо-[*a*]феноксазинилия кислый сульфат.

Кристаллический порошок зелёного цвета с бронзовым блеском. Умеренно растворим в 96% спирте, кислоте уксусной ледяной и пиридине.

Раствор 0,005 г/л в *спирте (50%, об/об) Р* имеет максимум поглощения *(2.2.25)* при длине волны 640 нм.

Нильского синего А раствор. *1058201.* Раствор 10 г/л в *кислоте уксусной безводной Р.*

Испытание на чувствительность. К 50 мл *кислоты уксусной безводной* Р прибавляют 0,25 мл раствора нильского синего А; появляется голубое окрашивание, которое переходит в сине-зелёное при прибавлении не более 0,1 мл *0,1 М раствора кислоты хлорной.*

Изменение окраски. От синей до красной в интервале рН 9.0-13.0.

Нингидрин. $C_9H_4O_3 \cdot H_2O$ (*М.м.* 178,1). *1058300.* [485-47-2].

1,2,3-Индантрион моногидрат.

Кристаллический порошок белого или слегка жёлтого цвета. Растворим в воде и 96% спирте, мало растворим в эфире.

\# Ядовит. Хранят в защищенном от света месте.

Нингидрина и олова (II) хлорида реактив. *1058301.*

0,2 г *нингидрина Р* растворяют в 4 мл горячей *воды Р,* прибавляют 5 мл раствора 1,6 г/л *олова (II) хлорида Р,* оставляют на 30 мин, фильтруют и хранят при температуре от 2°С до 8°С.

Непосредственно перед использованием к 2,5 мл полученного раствора прибавляют 5 мл *воды Р* и 45 мл *2-пропанола Р.*

Нингидрина и олова (II) хлорида реактив Р1. *1058302.*

4 г *нингидрина Р* растворяютв 100 мл *моноэтилового эфира этиленгликоля Р.* Осторожно встряхивают с 1 г *смолы катионообменной Р* (от 300 мкм до 840 мкм) и фильтруют (раствор А). 0,16 г *олова (II) хлорида Р* растворяют в 100 мл *буферного раствора рН 5,5 Р* (раствор В).

Непосредственно перед использованием смешивают равные объёмы растворов А и В.

Нингидрина раствор. *1058303.*

Раствор 2 г/л *нингидрина Р* в смеси растворителей *кислота уксусная разведенная Р-бутанол Р(5:95).*

Нингидрина раствор Р1. *1058304.*

1,0 г *нингидрина Р* растворяют в 50 мл *96% спирта Р* и прибавляют 10 мл *кислоты уксусной ледяной Р.*

Нингидрина раствор Р2. *1058305.*

3 г *нингидрина Р* растворяют в 100 мл раствора 45,5 г/л *натрия метабисульфита Р.*

Нингидрина раствор Р3. *1058306.*

Раствор 4 г/л *нингидрина Р* в смеси растворителей *кислота уксусная безводная Р-бутанол Р* (5:95).

Нипагин. См. *Метилпарагидроксибензоат.*

Нипазол. См. *Пропилпарагидроксибензоат.*

Нитроанилин. $C_6H_6N_2O_2$. *(М.м.* 138,1). *1058600.* [100-01-6]. 4-Нитроанилин.

П-Нитроанилин.

Кристаллический порошок ярко-жёлтого цвета. Очень мало растворим в воде, умеренно растворим в кипящей воде, растворим в 96% спирте и эфире, образует водорастворимые соли с сильными минеральными кислотами.

Температура плавления: около 147°С.

Нитробензальдегид. $C_7H_5NO_3$. *(М.м.* 151,1). *1058700.* [552-89-6]. 2-Нитробензальдегид.

Игольчатые кристаллы желтого цвета. Мало растворим в воде, легко растворим в 96% спирте, растворим в эфире, сублимируется паром.

Температура плавления: около 42°С.

Нитробензальдегидная бумага. *1058701.*

0,2 *г нитробензальдегида Р* растворяют в 10 мл раствора 200 г/л *натрия гидроксида Р.* Срок годности раствора 1 ч. В полученный раствор погружают нижнюю половину полоски из медленно фильтрующей бумаги длиной 10 см и шириной 0,8 —1 см. Избыток реактива удаляют, промокая полоску между двумя листами фильтровальной бумаги.

Используют в течение нескольких минут после приготовления.

Нитробензальдегида раствор. *1058702.*

0,12 г порошка *нитробензальдегида Р* прибавляют к 10 *мл раствора натрия гидроксида разведенного Р,* встряхивают в течение 10 мин и фильтруют.

Готовят непосредственно перед использованием.

Нитробензилхлорид. $C_7H_6ClNO_2$. *(М.м.* 171,6). *1059000.* [100-14-1].

4-Нитробензилхлорид.

Кристаллы светло-жёлтого цвета. Вызывает слезотечение. Практически нерастворим в воде, очень легко растворим в 96% спирте и эфире.

Нитробензоилхлорид. $C_7H_4ClNO_3$. *(М.м.* 185,6). *1058900.* [122-04-3].

4-Нитробензоилхлорид.

Кристаллы или кристаллическая масса жёлтого цвета, расплывающаяся на воздухе. Растворим в растворе натрия гидроксида с образованием желтовато-оранжевого окрашивания.

Температура плавления: около 72°С.

Нитробензол. $C_6H_5NO_2$. *(М.м.* 123,1). *1058800.* [98-95-3].

Бесцветная или слегка желтоватого цвета жидкость. Практически нерастворим в воде, смешивается с 96% спиртом и эфиром.

Температура кипения: около 211°С.

Динитробензол. К 0,1 мл нитробензола прибавляют 5 мл *ацетона Р*, 5 мл *воды Р* и 5 мл раствора *натрия гидроксида концентрированного Р* и встряхивают; после разделения слоёв верхний слой должен быть почти бесцветным.

4-(4-Нитробензил)пиридин. $C_{12}H_{10}N_2O_2$. (*М.м.* 214,2). *1101900.* [1083-48-3].

Порошок жёлтого цвета.

Температура плавления: около 70°С.

Нитрованадомолибденовый реактив. *1060100.* См. *Нитромолибденованадиевый реактив.*

Нитрозодипропиламин. $C_6H_{14}N_20$. *(М.м.* 130,2). 1099900. [621-64-7]. Дипропилнитрозамин.

Жидкость. Растворим в этаноле, эфире и концентрированных кислотах.

d_{20}^{20} :около 0,915.

Температура кипения: около 78°С.

Степень чистоты подходит для определения хемилюминесценции.

Нитрозодипропиламина раствор. *1099901.*

Вводят 78,62 г *этанола Р,* прокалывая инъекционной иглой пробку сосуда, содержащего *нитрозодипропиламин Р,* разбавляют *этанолом Р в* соотношении 1:100 и помещают по 0,5 мл в контейнеры с обжатыми крышками.

Хранят в защищённом от света месте при температуре 5°С.

Нитрометан. CH_3NO_2. *(М.м.* 61,0). *1059700.* -52-5].

Прозрачная, бесцветная, маслянистая жидкость. Мало растворим в воде, смешивается с 96% спиртом и эфиром.

d_{20}^{20} : 1,132 до 1,134.

n_D^{20} : 1,381 до 1,383.

Температурные пределы перегонки (2.2.11). От 100°С до 103°С; должно перегоняться не менее 95%.

Нитромолибденованадиевый реактив. *1060100.*

Раствор I. 10 г *аммония молибдата Р* растворяют в воде *Р,* прибавляют 1 мл *раствора аммиака Р* и доводят объём раствора *водой Р* до 100 мл.

Раствор II. 2,5 г *аммония ванадата Р* растворяют горячей *воде Р,* прибавляют 14 мл *кислоты азотной Р* и доводят объём раствора *водой Р*до 500 мл.

К 96 мл кислоты азотной Р прибавляют 100 мл раствора I и 100 мл раствора II и доводят объём раствора *водой Р* до 500 мл.

Нитротетразолиевый синий. $C_{40}H_{30}Cl_2N_{10}O_6$. *(М.м.* 818). *1060000.* [298-83-9]. 3,3'-(3,3'-Диметокси-4,4'-дифенилен)ди[2-(4-нитрофенил)-5-фенил-2Н-тетразолия] дихлорид. n-Нитротетразолиевый синий.

Кристаллы. Растворим в метаноле с образованием прозрачного раствора жёлтого цвета.

Температура плавления: около 189°С с разложением.

Нитрофурантоин. $C_8H_6N_4O_5$. *(М.м.* 238,2). *1099700.* [67-20-9]. 1-[[(5-нитрофуран-2-ил)метилен]амино]имидазолидин-2,4-дион.

Содержит не менее 98,0% и не более 102,0% $C_8H_6N_4O_5$ в пересчете на сухое вещество.

Желтый кристаллический порошок или желтые кристаллы, без запаха или почти без запаха. Очень мало растворим в воде и 96% спирте, растворим в диметилформамиде.

(5-Нитро-2-фурил)метилена диацетат. $C_9H_9NO_7$. *(М.м.* 243,2). *1099800.* [92-55-7]. Нитрофурфурола диацетат. 5-Нитрофурфурилидена диацетат.

Кристаллы жёлтого цвета. Температура плавления: около 90°С.

Нитрохромовый реактив. *1059100.*

0,7 г *калия дихромата Р* растворяют в *кислоте азотной Р* и доводят объём раствора той же кислотой до 100 мл.

Нитроэтан. $C_2H_5NO_2$. *(М.м.* 75,1). *1059200.* [79-24-3].

Прозрачная, бесцветная, маслянистая жидкость.

Температура кипения: около 114°С.

Нордазепам. $C_{15}H_{11}ClN_2O$. *(М.м.* 270,7). *1060200.* [340-57-8] .

7-Хлор-2,3-дигидро-5-фенил- 1 Н- 1 ,4-бензодиазепин-2-он.

Кристаллический порошок белого или светло-жёлтого цвета. Практически нерастворим в воде, мало растворим в 96% спирте.

Температура плавления: около 216°С.

D,L-Норлейцин.$C_6H_{13}NO_2$. (*М.м.* 131,2). *1060300.* [616-06-8]. (RS)-2-Аминогексановая кислота. Аминокапроновая кислота.

Блестящие кристаллы. Умеренно растворим в воде, растворим в кислотах.

Норпсевдоэфедрина гидрохлорид. $C_9H_{14}ClNO$. *(М.м.* 187,7). *1060400.* [53643-20-2]. *(1R.2R)-* или (1 S,2S)-2-Амино- 1 -фенилпропанола гидрохлорид.

Кристаллический порошок. Растворим в воде.

Температура плавления: от 180°С до 181°С.

Носкапина гидрохлорид. $C_{22}H_{24}ClNO_7 \cdot H_2O$. *(М.м.* 467,9). *1060500.*
(3*S*)-6,7-диметокси-3-[(5*R*)-4-метоки-6-метил-5,6,7,8-тетрагидра-1,3-диоксоло[4,5-*g*]изоквинолин-5-ил]изобензофуран-1(3*H*)-он гидрохлорид. [912-60-7].
Содержит не менее 98,5% и не более 100,5% $C_{22}H_{24}ClNO_7$ в пересчете на сухое вещество.
Белый кристаллический порошок или бесцветные кристаллы. Гигроскопичен. Легко растворим в воде и 96% спирте. Водные растворы слабо кислые. При стоянии растворов может выпадать осадок основания.
Температура плавления около 200°С с разложением.
Потеря в массе при высушивании (2.2.32). От 2,5% до 6,5%. Из навески субстанции 0,200 г при температуре 100°С-105°С.
Хранят в плотно укупоренном контейнере, в защищенном от света месте.

Обесцвечивающий раствор. *1012202.*

Смесь растворителей *кислота уксусная ледяная Р - метанол Р - вода Р(1* :4:5).

9-Оксиксантен. См. *Ксангидрол.*

4-Окситолуол. См. *Крезол.*

8-Оксихинолин. C_9H_7NO. *(М.м.* 145,2). *a* -Оксихинолин. Оксин.

Желтоватый мелкокристаллический порошок.

Октадекановая кислота. См. *Стеариновая кислота.*

Октадецил[3-[3,5-бис(1,1-диметилэтил)-4-гидроксифенил]пропионат]. $C_{35}H_{62}O_3$. *(М.м.* 530,9). *1060600.* [2082-79-3]. Октадецил-3-(3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидроксифенил)пропионат.

Кристаллический порошок белого или слегка желтоватого цвета. Практически нерастворим в воде, очень легко растворим в ацетоне и гексане, мало растворим в метаноле.

Температура плавления: от 49°C до 55°C.

Октанол. $C_8H_{18}O$. *(М.м.* 130,2). *1060700.* [111-87-5]. 1-Октанол. Каприловый спирт.

Бесцветная жидкость. Нерастворим в воде, смешивается с 96% спиртом и эфиром.

d_{20}^{20}: около 0,828.

Температура кипения: около 195°C.

3-Октанон. $C_8H_{16}O$. *(М.м.* 128,2). *1114600.* [106-68-3]. Этилпентилкетон.

Бесцветная жидкость с характерным запахом.

d_{20}^{20}: около 0,822.

n_D^{20}: около 1,415.

Температура кипения: около 167°C.

3-Октанон, используемый в газовой хроматографии, должен выдерживать следующее дополнительное испытание.

Количественное определение. Проводят методом газовой хроматографии *(2.2.28),* как указано в статье *Масло лавандовое.*

Испытуемый раствор. Испытуемое вещество.

Площадь основного пика должна быть не менее 98,0% суммы площадей всех пиков.

Октоксинол 10. $C_{34}H_{62}O_{11}$ (средняя). *(М.м.* 647). *1060800.* [9002-93-1].

-[4-(1,1,3,3-Тетраметилбутил)фенил]-*w* -гидроксиполи(оксиэтилен).

Прозрачная, вязкая жидкость светло-жёлтого цвета. Смешивается с водой, ацетоном и 96% спиртом, растворим в толуоле.

Хранят в воздухонепроницаемом контейнере.

Олеамид. $C_{18}H_{35}NO$. *(М.м.* 281,5). *1060900. (Z)-* Октадек-9-еноамид.

Порошок или гранулы от белого до желтоватого цвета. Практически нерастворим в воде, очень легко растворим в метиленхлориде, растворим в этаноле.

Температура плавления: около 80°C.

Оливковое масло. *1061000.* [8001-25-0].

Оливковое масло - масло, полученное методом холодного прессования или дугим механическим методом из зрелых плодов *Olea europaea* L.

Прозрачная, желтая или зеленовато-желтая жидкость с характерным запахом. Практически нерастворимо в 96% спирте, смешивается с петролейным эфиром (50^oC-70^o). При охлаждении до температуры 10^oC мутнеет, а при температуре 0^oC превращается в маслообразную массу.

d_{20}^{20}: около 0,913.

Хранят в заполненных доверху контейнерах, в защищенном от света метсе при температуре не выше 25^oC.

Олова (II) хлорид. $SnCl_2·2H_2O$. *(М.м.* 225,6). *1085000.* [10025-69-1]. Олова дихлорид дигидрат.

Содержит не менее 97,0% $SnCl_2·2H_2O$.

Бесцветные кристаллы. Очень легко растворим в воде, легко растворим в 96% спирте, кислоте уксусной ледяной, кислоте хлористоводородной разведенной и концентрированной.

Количественное определение. 0,500 г помещают в колбу с притертой стеклянной пробкой, растворяют в 15 мл *кислоты хлористоводородной Р,* прибавляют 10 мл *воды Р и* 5 мл *хлороформа Р.* Быстро титруют *0,05 М раствором калия йодата* до обесцвечивания хлороформного слоя.

1 мл *0,05 М раствора калия йодата* соответствует 22,56 мг $SnCI_2·2H_20$.

Олова (II) хлорида раствор. *1085001.*

20 г *олова Р* нагревают с 85 мл *кислоты хлористоводородной Р* до прекращения выделения водорода, охлаждают.

Хранят раствор над избытком *олова Р,* защищая от воздуха.

Олова (II) хлорида раствор Р1. *1085002.*

Непосредственно перед использованием *раствор олова (II) хлорида Р* разводят *кислотой хлористоводородной разведенной Р (*1:10).

Олова (II) хлорида раствор Р2. *1085003.*

К 8 г *олова (II) хлорида Р* прибавляют 100 мл раствора 20% (об/об) *кислоты хлористоводородной Р,* встряхивают до растворения, если необходимо, нагревают на водяной бане при температуре 50°C и пропускают *азот Р* в течение 15 мин.

Готовят непосредственно перед использованием.

Олово. Sn. *(А.м.* 118,7). *1090800.* [7440-31-5].

Гранулы серебристо-белого цвета. Растворимо в кислоте хлористоводородной с выделением водорода.

Мышьяк (2.4.2, метод А). Не более 0,001% (10 ppm). 0,1 г должен выдерживать испытание на мышьяк.

Оллпорта реактив. См. *Диметиламинобензальдегида раствор Р6.*

Орацетовый синий 2R. $C_{20}H_{14}N_2O_2$. *(М.м.* 314,3). *1061100.* [4395-65-7]. Цветной индекс № 61110. 1-Амино-4-(фениламино)-антрацен-9,10-дион.

Температура плавления: около 194°C.

Орацетовый синий В. *1118600.* Смесь 1-метиламино-4-анилинантрахинона ($C_{21}H_{16}N_2O_2$; *М.м.* 328,4) и 1-амино-4-анилинантрахинона ($C_{20}H_{14}N_2O_2$; *М.м.* 314,3).

Порошок сине-фиолетового цвета. Практически нерастворим в воде, легко растворим в ацетоне и кислоте уксусной безводной.

Орцин. $C_7H_8O_2 \cdot H_2O$. *(М.м.* 142,2). *1108700.* [6153-39-5].

5-Метилбензол-1,3-диол моногидрат.

Кристаллический порошок, чувствителен к свету.

Температура кипения: около 290°С.

Температура плавления: от 58°С от 61°С.

Осмия (VIII) оксид. OsO_4. *(М.м.* 254,2). *1061200.* [20816-12-0]. Осмия тетраоксид.

Игольчатые кристаллы светло-жёлтого цвета или кристаллическая масса жёлтого цвета. Гигроскопичен, чувствителен к свету, растворим в воде, 96% спирте и эфире.

Хранят в воздухонепроницаемом контейнере.

Осмия (VIII) оксида раствор. *1061201.*

Раствор 2,5 г/л в *0,05 М растворе кислоты серной.*

Палладий. Pd. *(А.м.* 106,4). *1114700.* [7440-05-3].

Металл серовато-белого цвета. Растворим в кислоте хлористоводородной.

Палладия хлорид. $PdCl_2$. *(М.м.* 177,3). *1061500.* [7647-10-1].

Кристаллы красного цвета.

Температура плавления: от 678°С до 680°С.

Палладия хлорида раствор. *1061501.*

1 г *палладия хлорида Р* растворяют в 10 мл тёплой *кислоты хлористоводородной Р,* полученный раствор доводят смесью равных объемов *кислоты хлористоводородной разведенной Р* и *воды Р* до объёма 250 мл.

Непосредственно перед использованием раствор разбавляют двумя объёмами *воды Р.*

Пальмитиновая кислота. $C_{16}H_{32}O_2$. *(М.м.* 256.4). *1061600.* [57-10-3]. Гексадекановая кислота.

Кристаллические чешуйки белого цвета. Практически не растворима в воде, легко растворима в горячем 96% спирте и эфире.

Температура плавления: около 63°С.

Хроматография. Определение проводят, как указано в статье *Хлорамфеникола пальмитат;* на полученной хроматограмме должно обнаруживаться только одно основное пятно.

Панкреатина порошок. *1061700.*

Панкреатина порошок получают из свежих или замороженных поджелудочных желез млекопитающих. Содержит различные ферменты, обладающие протолитической, липолитической и амилолитической активностью. 1 мг панкреатина содержит не менее 1,0 ЕФЕ общей протолитической активности, 15 ЕФЕ липолитической активности и 12 ЕФЕ амилолитической активности.

Слегка коричневый аморфный порошок. Частично растворим в воде, практически нерастворим в 96% спирте и эфире.

Хранят в плотно укупоренном контейнере при температре от 2°C до 8°C.

Папаверина гидрохлорид. $C_{20}H_{22}ClNO_4$. (*М.м.* 375,9). *1061800.* [61-25-6]. 1-(3,4-диметоксибензил)-6,7-диметоксиизохинолина гидрохлорид.

Содержит не менее 99,05 и не более 101,0% $C_{20}H_{22}ClNO_4$ в пересчете на сухое вещество.

Кристаллический порошок или кристаллы белого цвета или почти белого цвета. Умеренно растворим в воде, мало растворим в 96% спирте.

Потеря в массе при высушивании (*2.2.32*). Не более 1,0%. 1,000 г субстанции сушат при температуре от 100°C до 105°C.

Парарозанилина гидрохлорид. $C_{19}H_{18}ClN_3$. (*М.м.* 323,8). *1062200.* [569-61-9]. Показатель Шульца №779. Цветной индекс №42500.

4-[Бис(4-аминофенил)метилен]циклогекса-2,5-диенииминия хлорид.

Кристаллический порошок синевато-красного цвета. Мало растворим в воде, растворим в этаноле, практически нерастворим в эфире. Растворы в воде и этаноле имеют интенсивную красную окраску, растворы в кислоте серной и кислоте хлористоводородной имеют жёлтую окраску.

Температура плавления: около 270°C с разложением.

Парарозанилина обесцвеченный раствор. *1062201.*

0,1 г *Парарозанилина гидрохлорида Р* помещают в колбу с притертой стеклянной пробкой, прибавляют 60 мл *воды Р* и раствора 1.0 г *натрия сульфита безводного Р,* или раствора 2,0 г *натрия сульфита Р,* или раствора 0,75 г *натрия метабисульфита Р в* 10 мл *воды Р,* затем медленно при перемешивании прибавляют 6 мл *кислоты хлористоводородной разведенной Р,* закрывают колбу пробкой и продолжают перемешивание до растворения, объём полученного раствора доводят *водой* Р до 100 мл.

Раствор используют через 12 ч после приготовления.

Хранят в защищённом от света месте.

Парафин жидкий. См. *Вазелиновое масло.*

Парафин твердый.

Очищенная смесь твердых насыщенных гидрокарбонатов обычно полученных из нефти. Может содержать антиоксидант.

Бесцветная или белая масса. Практически нерастворим в воде, легко растворим в метиленхлориде, практически нерастворим в 96% спирте. Расплавленная масса парафина не флюоресцицует при дневном свете.

Температура плавления (2.2.16): от 50°C до 61°C.

Хранят в защищенном от света месте.

Парацетамол. $C_8H_9NO_2$. (*М.м.* 151,2). *1061900.* [103-90-2].

N-(4-гидроксифенил)ацетамид.

Содержит не менее 99,0% и не более 101,0% $C_8H_9NO_2$ в пересчете на сухое вещество.

Кристаллический порошок белого цвета. Умеренно растворим в воде, легко растворим в 96% спирте, очень мало растворим в метиленхлориде.

Потеря в массе при высушивании (2.2.32). Не более 0,5%. 1,000 г субстанции сушат при температуре от 100°С до 105°С.

Хранят в защищенном от света месте.

Парацетамол, свободный от 4-аминофенола. *1061901.*

Парацетамол Р перекристаллизовывают из *воды Р* и сушат в вакууме при температуре 70°С; процедуру повторяют до тех пор, пока парацетамол не будет выдерживать следующее испытание: 5 г высушенного парацетамола растворяют в смеси равных объёмов *метанола Р* и *воды Р* и доводят объём раствора той же смесью растворителей до 100 мл. Прибавляют 1 мл свежеприготовленного раствора, содержащего 10 г/л *натрия нитропруссида Р* и 10 г/л *натрия карбоната безводного Р,* перемешивают и выдерживают в течение 30 мин в защищённом от света месте. Не должно появляться синее или зелёное окрашивание.

Пенициллиназы раствор. *1062300.*

10 г казеина гидролизата, 2,72 г *калия дигидрофосфата Р* и 5,88 г *натрия цитрата Р* растворяют в 200 мл *воды Р,* доводят рН до 7,2 раствором 200 г/л *натрия гидроксида Р* и доводят *водой Р до* объёма 1000 мл.

0,41 г *магния сульфата Р* растворяют в 5 мл *воды Р,* прибавляют 1 мл раствора 1,6 г/л *железа (II) аммония сульфата Р* и доводят объём раствора *водой* Р до 10 мл.

Стерилизуют оба раствора нагреванием в автоклаве, охлаждают, смешивают, распределяют тонкими слоями в конических колбах и культивируют с *Bacillus cereus* (NCTC 9946). Выдерживают колбы при температуре от 18°С до 37°С до явных признаков роста, а затем выдерживают при температуре от 35°С до 37°С в течение 16 ч, постоянно встряхивая для обеспечения максимальной аэрации. Центрифугируют, надосадочную жидкость стерилизуют методом мембранной фильтрации. 1,0 мл раствора пенициллиназы содержит не менее 0,4 микрокатал (что соответствует гидролизу не менее 500 мг бензилпенициллина до бензилпенициллиновой кислоты в час) при температуре 30°С и рН 7, при условии, что концентрация бензилпенициллина не опускается ниже уровня, необходимого для ферментного насыщения.

Константа Михаэлиса для пенициллиназы по бензилпенициллину в растворе пенициллиназы составляет около 12 мкг/мл.

Стерильность (2.6.1). Должен выдерживать испытание на стерильность.

Хранят при температуре от О°С до 2°С и используют в течение 2-3 сут. Лиофилизированный препарат хранят в запаянных ампулах в течение нескольких месяцев.

Пентан. C_5H_{12}. *(М.м.* 72,2). *1062500.* [109-66-0];

Прозрачная, бесцветная, воспламеняющаяся жидкость. Очень мало растворим в воде, смешивается с ацетоном, этанолом и эфиром.

d_{20}^{20}: около 0,63.

n_D^{20}: около 1,359.

Температура кипения: около 36°С.

Пентан, используемый в спектрофотометрии, должен выдерживать следующее дополнительное испытание.

Минимальное пропускание (2.2.25) определяют, используя в качестве компенсационной жидкости *воду Р:*

20% при длине волны 200 нм,

50% при длине волны 210 нм,

85% при длине волны 220 нм,

93% при длине волны 230 нм,

98% при длине волны 240 нм.

Пентанол. $C_5H_{12}O$. *(М.м.* 88.,). *1062600.* [71-41-0]. 1-Пентанол. *н*-Амиловый спирт.

Бесцветная жидкость. Умеренно растворим в воде, смешивается с 96% спиртом и эфиром.

n_D^{20} : около 1,410.

Температура кипения: около 137°С.

Пентаэритритилтетракис[3-(3,5-ди(1,1-диметилэтил)-4-гидроксифенил)пропионат]. $C_{73}H_{108}O_{12.}$ *(М.м.* 1178). *1062400.* [6683-19-8]. Пентаэритритилтетракис[3-(3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксифенил)пропионат].2,2'-бис(Гидроксиметил)пропан-1,3-диолтетракис[3-[3,5-ди(1,1-диметил| этил)-4-гидроксифенил]] пропионат.

Кристаллический порошок от белого до слегка жёлтого цвета. Практически нерастворим в воде, очень легко растворим в ацетоне, растворим в метаноле, мало растворим в гексане.

Температура плавления: от 110°С до 125°С.

a -форма: от 120°С до 125°С.

b -форма: от 110°С до 115°С.

трет-Пентиловый спирт. $C_5H_{12}O$. *(Мм.* 88,1) *1062700.* [75-85-4]. mрет-Амиловый спирт. 2-Метил-2-бутанол.

Летучая воспламеняющаяся жидкость. Легко растворим в воде, смешивается с 96% спиртом, эфиром и глицерином.

d_{20}^{20} : около 0,81.

Температурные пределы перегонки (2.2.11). От 100°С до 104°С; должно перегоняться не менее 95%.

Хранят в защищённом от света месте.

Пепсина порошок. *1062800.* [9001-75-6].

Пепсина порошок получают из слизистой оболочки желудка свиней, рогатого скота или овец. Содержит желудочные протеиназы, активные в кислой среде (pH 1 - 5). Имеет актиность не менее 0,5 ЕФЕ/мг, в пересчете на сухое вещество.

Белый или слегка желтый кристаллический или аморфный порошок. Гигроскопичен. Растворимв в воде, практически нерастворим в 96% спирте. Водные растворы имеют слабую опалесценцию и слабокислую реакцию.

Потеря в массе при высушивании (2.2.32). Не более 5% из навески 0,500 г при температуре 60°С над *фосфора (V) оксидом Р* при давлении не выше 670 Па в течение 4 ч.

Хранят в плотно укупоренном контейнере при температре от 2°С до 8°С.

Песок. *1075800.*

Крупинки кремния диоксида белого или слегка сероватого цвета с размером частиц от 150 мкм до 300 мкм.

Петролейный эфир. *1063100.* [8032-32-4].

Прозрачная, бесцветная, воспламеняющаяся жидкость, не флуоресцирует. Практически нерастворим в воде, смешивается с 96% спиртом.

d_{20}^{20}*:* от 0,661 до 0,664.

Температурные пределы перегонки. (2.2.11). От 50°С до 70°С.

Петролейный эфир Р1. *1063101.*

Должен выдерживать требования для *петролейного эфира Р* со следующими изменениями:

d_{20}^{20}*:* от 0,630 до 0,656.

Температурные пределы перегонки (2.2.11). От 40°С до 60°С.

Не должен мутнеть при температуре О°С.

Петролейный эфир Р2. *1063102.*

Должен выдерживать требования для *петролейного эфира Р* со следующими изменениями:

d_{20}^{20}: от 0,620 до 0,630.

Температурные пределы перегонки (2.2.11). От 30°С до 40°С.

Не должен мутнеть при температуре О°С.

Петролейный эфир Р3. *1063103.*

Должен выдерживать требования для *петролейного эфира Р со* следующими изменениями:

d_{20}^{20}*:* от 0,659 до 0,671.

Температурные пределы перегонки (2.2.11). От 40°С до 80°С.

Пикриновая кислота. $C_6H_3N_3O_7$. *(М.м.* 229,1). *1065800.* [88-89-1]. 2,4,6-Тринитрофенол.Призмы или пластинки жёлтого цвета. Растворима в воде и 96% спирте. Ядовита.

Хранят увлажнённой водой Р.

Пикриновой кислоты насыщенный раствор в этаноле. 6,25 г пикриновой кислоты Р заливают 100 мл этанола Р и оставляют при частом взбалтывании на 24 ч.

Хранят в стеклянных контейнерах с притертыми пробками в защищенном от света месте, вдали от огня.

Пикриновой кислоты раствор. *1065801.* Раствор 10 г/л.

Пикриновой кислоты раствор Р1.*1065802.*

К 100 мл насыщенного раствора *кислоты пикриновой Р* прибавляют 0,25 мл *раствора натрия гидроксида концентрированного Р.*

β-Пинен. $C_{10}H_{16}$. *(М.м.* 136,2). *1109000.* [19902-08-0].

6,6-Диметил-2-метиленбицик-ло[3.1.1]гептан.

Бесцветная, маслянистая жидкость с запахом, напоминающим скипидар. Практически не растворим в воде, смешивается с 96% спиртом и эфиром.

d_{20}^{20}*:* около 0,867.

n_D^{20}: около 1,474.

Температура кипения: от 155°C до 156°C.

β-Пинен, используемый в газовой хроматографии, должен выдерживать следующее дополнительное испытание.

Количественное определение. Проводят методом газовой хроматографии *(2.2.28),* как указано в статье *Масло цветков померанца,* используя β-пинен в качестве испытуемого раствора.

Площадь основного пика должна быть не менее 99,0% суммы площадей всех пиков.

Пиперазина гидрат. $C_4H_{10}N_2 \cdot 6H_2O$. *(М.м.* 194,2). *1065900* [142-63-2]. Пиперазина гексагидрат.

Содержит не менее 98,0% и не более 101,0% $C_4H_{10}N_2 \cdot 6H_2O$.

Бесцветные кристаллы. Легко растворим в воде и 96% спирте, очень мало растворим в эфире.

Температура плавления: около 43°C.

Хранят в плотно укупоренном контейнере, в защищенном от света месте.

Пиперидин. $C_5H_{11}N$. *(М.м.* 85,2). *1066000.* [110-89-4]. Гексагидропиридин.

Бесцветная или слегка желтоватого цвета жидкость, имеет щелочную реакцию. Смешивается с водой, 96% спиртом, эфиром и петролейным эфиром.

Температура кипения: около 106°C.

Пирид-2-иламин. $C_5H_6N_2$. *(М.м.* 94,1). *1073400.* [504-29-0]. 2-Аминопиридин.

Крупные кристаллы. Растворим в воде, 96% спирте и эфире.

Температура кипения: около 210°C.

Температура плавления: около 58°C.

Пиридилазонафтол. $C_{15}H_{11}N_3O$. *(М.м.* 249,3). *1073500.* [85-85-8]. 1-(2-Пиридилазо)-2-нафтол.

Порошок кирпично-красного цвета. Практически нерастворим в воде, растворим в 96% спирте, метаноле и горячих разведенных растворах гидроксидов щелочных металлов.

Температура плавления: около 138°C.

Пиридилазонафтола раствор. *1073501.*

Раствор 1 г/л *в этаноле Р.*

Испытание на чувствительность. К 50 мл *воды Р* прибавляют 10 мл *ацетатного буферного раствора рН 4,4 Р,* 0,10 мл *0,02 М раствора натрия эдетата* и 0,25 мл раствора пиридилазонафтола; после прибавления 0,15 мл раствора 5 г/л *меди (II) сульфата Р* окраска должна измениться от светло-жёлтой к фиолетовой.

Пиридин. C_5H_5M. *(М.м.* 79,1). *1073200.* [110-86-1].

Прозрачная, бесцветная, гигроскопичная жидкость. Смешивается с водой и 96% спиртом. Ядовит.

Температура кипения: около 115°C.

Хранят в воздухонепроницаемом контейнере.

Пиридин безводный. *1073300.* [110-86-1].

Пиридин Р сушат над *натрия карбонатом безводным Р,* фильтруют и перегоняют.

Вода (2.5.12). Не более 0,01% *(м/м).*

Пировиноградная кислота. $C_3H_4O_3$. *(М.м.* 88,1). *1109300.* [127-17-3].

2-Оксопропановая кислота.

Жидкость желтоватого цвета. Смешивается с водой, этанолом и эфиром.

d_{20}^{20} : около 1,267.

n_D^{20} : около 1,413.

Температура кипения: около 165"С.

Пирогаллол. $C_6H_6O_3$. *(М.м.* 126,1). *1073700.* [87-66-1]. Бензол-1,2,3-триол.

Кристаллы белого цвета, под действием воздуха и света коричневеют. Очень легко растворим в воде, 96% спирте и эфире, мало растворим в углерода дисульфиде. Под действием воздуха водные растворы, а ещё быстрее щелочные растворы, приобретают коричневую окраску вследствие абсорбции кислорода.

Температура плавления: около 131°С.

Хранят в защищённом от света месте.

Пирогаллола щелочной раствор. *1073701.*

0,5 г *пирогаллола Р* растворяют в 2 мл *воды, свободной от углерода диоксида, Р.*

12 г *калия гидроксида Р* растворяют в 8 мл *воды, свободной от углерода диоксида, Р.*

Непосредственно перед использованием смешивают оба раствора.

Пирокатехин. $C_6H_6O_2$. *(М.м.* 110,1). *1073600.* [120-80-9]. Бензол-1,2-диол.

Бесцветные или слабо-жёлтого цвета кристаллы. Растворим в воде, ацетоне, 96% спирте и эфире.

Температура плавления: около 102°С.

Хранят в защищённом от света месте.

Плазма с пониженным содержанием тромбоцитов. *1066100.*

45 мл человеческой крови отбирают пластмассовым шприцем вместимостью 50 мл, содержащим 5 мл стерильного раствора 38 г/л *натрия цитрата Р,* и немедленно центрифугируют с ускорением 1500 *g* при температуре 4°С в течение 30 мин. Отбирают с помощью пластмассового шприца верхние 2/3 всплывшего слоя плазмы и немедленно центрифугируют с ускорением 3500 g при температуре 4°С в течение 30 мин. Отбирают верхние 2/3 слоя жидкости и быстро замораживают ее в необходимом количестве пластмассовых пробирок при температуре -40°С. Используют пластмассовое оборудование или оборудование, обработанное силиконом.

Плазмы субстрат. *1066200.*

Плазму отделяют от человеческой или бычьей крови, собирают в раствор 38 г/л *натрия цитрата Р,* объём которого составляет 1/9 объёма плазмы или в раствор, содержащий 20 г/л *динатрия гидроцитрата* Р и 25 г/л *глюкозы Р,* объём которого составляет 2/7 объёма плазмы. В первом случае субстрат готовят в день сбора крови; во втором случае субстрат готовят в течение 2 дней со дня сбора крови.

Хранят при температуре -20°С.

Плазмы субстрат Р1. *1066201.*

Для взятия и обработки крови используют водоотталкивающее оборудование (изготовленное из подходящих пластмасс или стекла, обработанного силиконом). Необходимый объём крови собирают от каждой из не менее пяти овец. Достаточным объёмом является отбор 285 мл крови в 15 мл раствора антикоагулянта, но и меньший объём может быть собран. Кровь берут у живого животного или во время убоя, используя иглу, присоединенную к подходящей канюле с длиной, достаточной для достижения дна сосуда для сбора. Отбрасывают первые несколько миллилитров и собирают только свободно текущую кровь. Кровь собирают в достаточное количество раствора антикоагулянта, содержащего 8.7 г *натрия цитрата Р* и 4 мг *апротинина Р в* 100 мл *воды Р.* Соотношение крови и раствора антикоагулянта должно быть 19:1. Во время сбора и сразу после него кровь слегка перемешивают, не допуская вспенивания. По окончанию сбора, сосуд закрывают и охлаждают до температуры от 10°С до 15°С. После охлаждения содержимое всех колб объединяют за исключением тех, в которых наблюдается явный гемолиз или образование сгустков, и хранят собранную кровь при температуре от 10°С до 15°С.

Как можно скорее, в пределах 4 ч после сбора, объединенную кровь центрифугируют с ускорением от 1000 g до 2000 g при температуре от 10°С до 15°С в течение 30 мин. Отделяют надосадочную жидкость и центрифугируют с ускорением 5000 g в течение 30 мин. (Если необходимо, для получения прозрачной плазмы можно центрифугировать с большим ускорением, например, с ускорением 20000 g в течение 30 мин, но фильтрация при этом недопустима). Отделяют надосадочную жидкость, немедленно тщательно перемешивают и помещают субстрат плазмы в небольшие контейнеры с пробками, порциями, достаточными для проведения полного количественного определения гепарина (например, от 10 мл до 30 мл). Сразу же, быстро охлаждают до температуры ниже -70°С (например, погружая контейнеры в жидкий азот) и хранят при температуре не выше -30°С.

Перед использованием необходимую порцию плазмы размораживают на водяной бане при температуре 37°С, осторожно перемешивая до полного размораживания. Размороженную плазму содержат при температуре от 10°С до 20°С и немедленно используют.

Если необходимо, размороженный субстрат плазмы слегка центрифугируют, но не фильтруют.

Плазма пригодна в качестве субстрата плазмы для количественного определения гепарина, если в условиях количественного определения она обеспечивает время образования сгустка, соответствующее использованному методу определения, и обеспечивает получение крутых логарифмических кривых доза -.отклик.

Плазмы субстрат Р2. *1066202.*

Готовят из человеческой крови, содержащей менее 1% обычного количества фактора IX. Собирают кровь в раствор 38 г/л *натрия цитрата Р,* объем которого составляет 1/9 объёма плазмы.

Хранят в небольших количествах в пластмассовых контейнерах при температуре

-30°С или ниже.

Плазмы субстрат с недостаточным содержанием фактора V. *1066300.*

Предпочтительно используют плазму, полученную от донора с врождённой недостаточностью, или готовят ее следующим образом: отделяют плазму от человеческой крови, собранной в раствор 13,4 г/л *натрия оксалата Р,* объём которого составляет 1/10 объёма крови. Культивируют при температуре 37°С от 24 ч до 36 ч. Время свёртывания, определенное по методу, описанному *для раствора*

фактора V свёртывания крови Р, должно быть от 70 с до 100 с. Если время свёртывания меньше 70 с, то культивируют снова от 12 ч до 24 ч.

Хранят в небольших количествах при температуре -20°С или ниже.

Плазминоген человеческий. *1109100.* [9001-91-6].

Вещество, присутствующее в крови, которое может быть активировано до плазмина, фермента, осуществляющего лизис фибрина в сгустках крови.

Повидон. Поливинилпирролидон. $C_{6n}H_{9n+2}N_nO_n$. *1068500.* [9003-39-8].

Порошок или пластинки белого или желтовато-белого цвета. Гигроскопичен. Легко растворим в воде, 96% спирте и метаноле, мало растворим в ацетоне.

Повидон представляет собой a -гидро-w гидрополи[1-(2-оксопиролидин-1-ил)этилен], который образуется из линейных полимеров 1-этенилпиролидин-2-она. Субстанция содержит не менее 11,5% и не более 12,8% азота (N, *А.м.*14,01), в пересчете на безводное вещество. Разные типы повидона характеризуются их вязкостью в растворе, выраженной как величина К. Величина К повидона может быть не менее 85,0% и не более 115,0% от номинального значения, если она имеет номинальное значение 15 или менее. Если величина К повидона имеет номинальное значение или среднее значение указанного интервала номинальных величин К более 15, величина К может быть не менее 90,0% и не более 108,0% от номинального значения или среднего значения.

Вода (2.5.12). Не более 5,0%. Определение проводят из 1,0 г субстанции.

Подсолнечное масло. *1086900.*

Жирное масло, полученное выдавливанием из семян *Helianthus annuus L.*

Прозрачная жидкость светло-жёлтого цвета.

d_{15}^{15} *:* около 0,92.

Гидроксильное число (2.5.3). От 14 до 16.

Йодное число (2.5.4). От 125 до 136.

Число омыления (2.5.6). От 188 до 194.

Поливинилпирролидон. См. *Повидон.*

Поли(виниловый спирт).

Получают методом полимеризации винилацетата с последующим частичным или почти полным гидролизом поли(винилацетата) в присутствии щелочей или минеральных кислот в качестве катализатора. Средняя относительная молекулярная масса от 20000 до 150000; вязкость от 3 до 70 мПа·с; эфирное число, характеризирующее степень гидролиза не более 280.

Желтовато-белый порошок или полупрозрачные гранулы. Растворим в воде, мало растворим в этаноле, практически нерастворим в ацетоне.

Потеря в массе при высушивании (2.2.32). Не более 5,0%. Определяют из навески 1,000 г высушиванием при температуре 100°С-105°С в течение 3 ч.

Поли(диметил)(дифенил)силоксан. *1066900.* DB-5, SE52.

Содержит 95% метильных групп и 5% фенильных групп.

Неподвижная фаза для газовой хроматографии.

Поли(диметил)(дифенил)(дивинил)силоксан. *1100000.* SE54.

Содержит 94% метильных групп, 5% фенильных групп и 1% винильных групп.

Неподвижная фаза для газовой хроматографии.

Поли(диметил)силоксан. *1066800.*

Каучук силиконовый (метил). Органосиликоновый полимер, имеющий вид полужидкой бесцветной смолы.

Характеристическая вязкость, определенная как указано ниже, должна быть около 115 мл·г$^{-1}$.

1,5 г, 1 г и 0,3 г поли(диметил)силоксана взвешивают с точностью до 0,1 мг в мерных колбах вместимостью 100 мл, прибавляют от 40 мл до 50 мл *толуола Р,* встряхивают до растворения и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл. Определяют вязкость *(2.2.9)* каждого раствора и вязкость *толуола Р* в тех же условиях. Концентрацию каждого раствора уменьшают вдвое, разбавляя *толуолом Р,* и определяют вязкость полученных растворов.

c — концентрация, г/100 мл;

t_1 — время истечения испытуемого раствора;

t_2 — время истечения толуола;

h_1, — вязкость испытуемого раствора, в мПа·с;

h_2 — вязкость толуола, в мПа·с;

d_1 — относительная плотность испытуемого раствора;

d_2 — относительная плотность толуола.

Для получения значений относительной плотности используют следующие данные:

Концентрация (с), г/100 мл	Относительная плотность (d_1)
0-0,5	1,000
0,5-1,25	1,001
1,25-2,20	1,002
2,20-2,75	1,003
2,75-3,20	1,004
3,30-3,75	1,005
3,75-4,50	1,006

Удельную вязкость *($h_{уд}$)* определяют по уравнению:

$$h_{уд} = \frac{h_1 - h_2}{h_2} = \frac{t_1 n_1}{t_2 n_2} - 1,$$

Приведенную вязкость *($h_{пр}$)* определяют по уравнению:

$$h_{пр} = \frac{h_{уд}}{c}$$

Характеристическую вязкость *(h)* получают экстраполяцией предыдущего уравнения до c = 0 Для этого строят кривую $h_{уд}/c$ или log $h_{уд}/c$ как функцию *c.* Экстраполяцией до *c* = 0 получают *h*. Характеристическую вязкость выражают в мл/г, поэтому полученное значение должно быть умножено на 100.

Инфракрасный спектр поглощения *(2.2.24),* полученный нанесением вещества, при необходимости диспергированного в нескольких каплях *углерода тетрахлорида Р,* на диск натрия хлорида, не должен иметь поглощения при длине волны 3053 $см^{-1}$, соответствующего винильным группам.

Потеря в массе при высушивании (2.2.32). Не более 2,0%. Определение проводят из 1,000 г, сушат в вакууме при температуре 350°С в течение 15 мин. Не более 0,8*%.* Определение проводят из 2,000 г, сушат при температуре 200°С в течение 2ч.

Полиметилфенилсилоксан. *1067900.*

Содержит 50% метильных групп и 50% фениль-ных групп. (Средняя молекулярная масса 4000).

Очень вязкая жидкость (вязкость около 1300мПа-с).

Неподвижная фаза для газовой хроматографии.

d_{25}^{25}: около 1,09.;

n_D^{25}: около 1,540.

Поли[метил(95)фенил(5)]силоксан. *68000.*

См.*Поли(диметил)(дифенил)силоксан Р.*

Поли[метил(94)фенил(5)винил(1)]силоксан. *1068100.*

См. *Поли(диметил)(дифенил)(дивинил)силоксан Р.*

Полиоксиэтилированное касторовое масло. *1068200.*

Жидкость светло-жёлтого цвета, становится прозрачной при температуре около 26°С.

Политсорбат 20. W+X+Y+Z=20. *1068300.* [9005-64-5].
Маслянистая жидкость желтого или коричневато-желтого цвета, прозрачная или слегка опалесцирующая. Смешивается с водой, этанолом, этилацетатом и метанолом, практически не растворим в жирных маслах и вазелиновом масле.
Полисорбат 20 – смесь продуктов неполного ацелирования сорбита и его ангидридов кислотой лауриновой, сополимеризованных из приблизительно 20 молями этиленоксида на каждый моль сорбита и ангидрида сорбита. Кислота лауриновая, используемая для ацелирования, может заменяться другими жирными кислотами.
d_{20}^{20}: около 1,10.
Кислотное число (2.5.1). Не более 2,0. 5,0 г субстанции растворяют в 50 мл описаной смеси растворителей.
Гидроксильное число (2.5.3, метод А). От 96 до 108. Определение проводят из 2,0 г субстанции.
Йодное число (2.5.4). Не более 5,0.
Число омыления (2.5.6). От 40 до 50. Определение проводят из 2,0 г субстанции. Используют 15,0 мл *0,5 М раствора калия гидроксида спиртового* и разводят перед титрованием *96% спиртом Р* до объема 50 мл.
Хранят в воздухонепроницаемом контейнере, в защищенном от света месте.

Полисорбат 80. Твин-80. *1068400.* [9005-65-6].
Смесь продуктов неполного ацелирования сорбита и его ангидридов различными жирными кислотами, главным образом кислотой олеиновой, сополимеризованных из приблизительно 20 молями этиленоксида на каждый моль сорбита и ангидрида сорбита. Фракция жирной кислоты может быть животного или растительного

происхождения. Содержит не менее 60,0% кислоты олеиновой. Содержит не менее 90,0% и не более 110,0% полисорбата 80.

Масляная желтоватая или коричневато-желтоватая прозрачная жидкость. Смешивается с водой, этанолом, этилацетатом, метанолом. Практически нерастворим в жиных маслах и жидком парафине (масле вазелиновом).

d_{20}^{20}: около 1,08.

Вязкость: около 400 мПа·с при 25°С.

Кислотное число (2.5.1). Не более 2,0. 5,0 г субстанции растворяют в 50 мл описаной смеси растворителей.

Гидроксильное число (2.5.3, метод А). От 65 до 80. Определение проводят из 2,0 г субстанции.

Перекисное число (2.5.5). Не более 10.

Число омыления (2.5.6). От 45 до 55. Определение проводят из 2,0 г субстанции. Используют 15,0 мл *0,5 М раствора калия гидроксида спиртового* и разводят перед титрованием *водой Р* до объема 50 мл.

Хранят в воздухонепроницаемом контейнере, в защищенном от света месте.

Полистирол 900- 1000. 1112200 [9003-53-6].

Органический стандарт, используемый для калибровки в газовой хроматографии.

M_w: около 950.

M_w/ M_n:1,10

Поли(цианопропил)силоксан. *1066700.*

Полисилоксан, замещенный на 100% цианопропильными группами.

Поли|[(цианопропил)(фенил)] [диметил] силоксан. *14800.*

Содержит 6% цианопропилфенильных групп и 94% диметильных групп.

Неподвижная фаза для газовой хроматографии.

Поли(цианопропил)(7)(фенил)(7)(метил)(86)силоксан. *1109200.*

Полисилоксан, замещеный на 7% цианопропильными группами, на 7% фенильными группами и на 86% диметильными группами.

Неподвижная фаза для газовой хроматографии.

Поли(цианопропил)(фенилметил)силоксан. *1066600.*

Держит 90% цианопропильных групп и 10% фенилметильных групп.

Неподвижная фаза для газовой хроматографии.

Поли[(цианопропил)метилфенилметилсилоксан]. *1066500.*

См. *Поли[(цианопропил)(метил)][(фенил)(метил)]силоксан Р.*

Поли[(цианопропил)(метил)|[(фенил)(метил)]силоксан. *1066500.*

Содержит 25% цианопропильных групп, 25% фенильных групп и 50% метильных групп. (Средняя молекулярная масса - 8000).

Очень вязкая жидкость (вязкость около 9000 мПа-с).

d_{25}^{25}: около 1,10.

n_D^{25}: около 1,502.

Полиэтиленгликоль 200. См. *Макрогол 200.*

Полиэтиленгликольадипинат. $(C_8H_{12}O_4)_n$, [*М.м.* $(172,2)_n$]. *1067700.*

Воскообразная масса белого цвета. Практически нерастворим в воде, растворим в хлороформе.

Температура плавления: около 43°С.

Полиэтиленгликольсукцинат. $(C_6H_8O_4)_n$. [*М.м.* $(144,1)_n$]. *1067800.*

Кристаллический порошок белого цвета. Практически нерастворим в воде, растворим в хлороформе.

Температура плавления: около 102°С.

Полиэфирный гидроксилированный гель для хроматографии. *1067000.*

Гель с небольшим размером частиц, имеющий гидрофильную поверхность к гидроксильным группам. Имеет предел эксклюзии по декстрану с молекулярной массой от$2 \cdot 10^5$до $2,5 \cdot 10^6$.

Прокаина гидрохлорид. $C_{13}H_{21}ClN_2O_2$. *(М.м.* 272,8). *1109400.*2-диэтиламиноэтил-4-аминобензоата гидрохлорид. Новокаинн.

Содержит не менее 99,0% и не более 101,0% $C_{13}H_{21}ClN_2O_2$ в пересчете на сухое вещество.

Кристаллический порошок белого цвета или бесцветные кристаллы. Очень легко растворим в воде, растворим в 96% спирте, практически нерастворим в эфире.

Потеря в массе при высушивании (2.2.32). Не более 0,5%. 1,00 г субстанции сушат при температуре от 100°С до 105°С.

Хранят в защищенном от света месте.

D-Пролил-L-фенилаланил-L-аргинин-4-нитроанилида дигидрохлорид. $C_{26}H_{36}Cl_2N_8O_5$. *(М.м.* 612). *1072800.*

Пропанол. C_3H_8O. *(М.м.* 60,1). *1072000.* [71-23-8]. 1-Пропанол.

Прозрачная, бесцветная жидкость. Смешивается с водой и 96% спиртом.

d_{20}^{20}: около от 0,802 до 0,806.

Температура кипения: около 97,2°С.

Температурные пределы перегонки (2.2.11). От 96°С до 99°С; должно перегоняться не менее 95%.

2-Пропанол. C_3H_8O. *(М.м.* 60,1). *1072100.* [67-63-0]. Изопропиловый спирт.

Прозрачная, бесцветная, воспламеняющаяся жидкость. Смешивается с водой и 96% спиртом.

d_{20}^{20}: около 0,785.

Температура кипения: от 81°С до 83°С.

2-Пропанол Р1. *1072101.*

Должен выдерживать требования для *2-пропанола Р* и следующие дополнительные требования:

n_D^{20}: около 1,378.

Вода (2.5.12). Не более 0,05%. Определение проводят из 10 г.

Минимальное пропускание (2.2.25) определяют, используя в качестве компенсационной жидкости *воду Р:*

25% при длине волны 210 нм,

55% при длине волны 220 нм,

75% при длине волны 230 нм,

95% при длине волны 250 нм,

98% при длине волны 260 нм.

Пропаноламин. C_3H_9NO. *(М.м.* 75,1). *1072200.* [156-87-6]. 3-Амино-1-пропанол.

Прозрачная, бесцветная, вязкая жидкость.

d_{20}^{20}*:* около 0,99.

n_D^{20}: около 1,461.

Температура плавления: около 11°C.

Пропилацетат. $C_5H_{10}O_2$. *(М.м.* 102,1). *1072600.* [109-60-4].

d_{20}^{20}*:* около 0,888.

Температура кипения: около 102°C.

Температура плавления: около -95°C.

Пропиленгликоль. $C_3H_8O_2$. *(М.м.* 76,1). *1072900.* [57-55-6]. (*RS*)-пропан-1,2-диол.

Вязкая, прозрачная, бесцветная жидкость. Гигроскопична. Смешивается с водой и 96% спиртом.

d_{20}^{20}*:* от 1,035 до 1,040.

n_D^{20}: от 1,431 до 1,433.

Хранят в воздухонепроницаемом контейнере.

Пропиленоксид. C_3H_6O. *(М.м.* 58,1). *1121800.*

Бесцветная жидкость. Смешивается с 96% спиртом.

Пропилпарагидроксибензоат. $C_{10}H_{12}O_3$. *(М.м.* 180,2). *1072700.* [94-13-3]. Пропил-4-гидроксибензоат. # Нипазол.

Содержит не менее 99,0% и не более 100,5% $C_{10}H_{12}O_3$.

Кристаллический порошок белого цвета. Очень мало растворим в воде, легко растворим в 96% спирте и метаноле.

Пропионовая кислота. $C_3H_6O_2$. *(М.м.* 74,1). *1072400.* [79-09-4].

Маслянистая жидкость. Растворима в 96% спирте и эфире, смешивается с водой.

d_{20}^{20}: около 0,993.

n_D^{20}: около 1,387.

Температура кипения: около 141°C.

Температура плавления: около -21°C.

Пропионовый альдегид. C_3H_6O. *(М.м.* 58,1). *1072300.* [123-38-6]. Пропаналь.

Жидкость. Легко растворим в воде, смешивается с 96% спиртом и эфиром.

d_{20}^{20} : около 0,81.

n_D^{20} : около 1,365.

Температура кипения: около 49°C.

Температура плавления: около -81°C.

Пропионовый ангидрид. $C_6H_{10}0_3$. *(М.м.* 130,1). 1072500. [123-62-6].

Прозрачная, бесцветная жидкость. Растворим в 96% спирте и эфире.

d_{20}^{20} : около 1,01.

Температура кипения: около 167°C.

Пропионового ангидрида реактив. *1072501.*

1 г *кислоты толуолсульфоновой Р* растворяют в 30 мл *кислоты уксусной ледяной Р* и прибавляют 5 мл *пропионового ангидрида Р.*

Используют через 15 мин после приготовления.

Срок годности 1 сут.

Протамина сульфат. *1073000.* [53597-25-4 (сальмин) 9007-31-2 (клупеин)].

Протамина сульфат – продукт белкового происхождения, получаемый из спермы разных видов рыб (обычно *Salmonidae* или *Clupeidae*). 1 мг протамина сульфата осаждает не менее 100 МЕ гепарина в пересчете на сухое вещество.

Белый или почти белый порошок. Гигроскопичен. Умеренно растворим в воде, практически нерастворим в 96% спирте.

Потеря в массе при высушивании (2.2.32). Максимум 5,0% из навески 1,000 г при температуре 100°С-105°С в течение 3 ч.

Хранят в герметично укупоренном контейнере.

Протеаза Staphylococcus aureus штамм V8. Тип XVII-B. *1115800.* [66676-43-5].

Микробиологический внеклеточный протеолитический фермент. Лиофилизированный порошок содержит от 500 единиц до 1000 единиц в 1 мг раствора.

Протравной чёрный 11. $C_{20}H_{l2}N_3NaO_7S$. *(М.м.* 461,4). *1056800.* [1787-61-7]. Показатель Шульца №241. Цветной индекс №14645. Натрия 2-гидрокси-1-[(1-гидроксинафт-2-ил)азо]-6-нитронафталин-4-сульфонат. # Эриохром чёрный. Хромоген черный. Кислотный хром черный специальный.

Порошок коричневато-чёрного цвета. Растворим в воде и 96% спирте.

Хранят в воздухонепроницаемом контейнере, в защищённом от света месте.

Протравного чёрного 11 индикаторная смесь. *1056801.*

1 г *протравного чёрного 11 Р* смешивают с 99 г *натрия хлорида Р.*

Испытание на чувствительность. 50 мг индикаторной смеси растворяют в 100 мл *воды Р;* появляется коричневато-фиолетовое окрашивание, которое должно перейти в синее при прибавлении 0,3 мл *раствора аммиака разведённого Р1*. При последующем прибавлении 0,1 мл раствора 10 г/л *магния сульфата Р* окраска должна измениться на фиолетовую.

Хранят в воздухонепоницаемом контейнере, в защищенном от света месте.

Прочный синий В, соль $C_{14}H_{12}Cl_2N_4O_2$. (*М.м.* 339,2). 1037400. [84633-94-3]. Показатель шульца №490. Цветной индекс № 37235, 3,3-Диметокси(бифенил)-4,4'-бисдиазония дихлорид.

Порошок темно-зелёного цвета. Растворим в воде. Стабилизирован цинка хлоридом.

Хранят в воздухонепроницаемом контейнере при температуре от 2°С до 8°С.

Прочный красный В, соль. $C_{17}H_{13}N_3O_9S_2$. (*М.м.* 467,4). 1037500. [56315-29-8]. Показатель Шульца №155. Цветной индекс №37125. 2-Метокси-4-нитробензол-диазония кислый нафталин-1,5-дисульфонат.

Порошок оранжево-жёлтого цвета. Растворим в воде, мало растворим в 96% спирте.

Хранят в воздухонепроницаемом контейнере, в защищённом от света месте при температуре от 2°С до 8°С.

Проявителя раствор. *1122500.*

К 2,5 мл раствора 20 г/л *кислоты лимонной Р* прибавляют 0,27 мл *формальдегида Р* и доводят объем смеси *водой Р* до 500,0 мл.

Пулегон. $C_{10}H_{16}O$. (*М.м.* 152,2). 1073100. [89-82-7]. (R) –2-Изопропилиден-5-метилциклогексанон. (+)-n-Мент-4-ен-3-он.

Бесцветная, маслянистая жидкость. Практически нерастворим в воде, смешивается 96% спиртом и эфиром.

d_{15}^{20} : около 0,936.

n_D^{20} : от 1,485 до 1,489.

$[a]_D^{20}$: от +19,5° до +22,5°.

Температура кипения: от 222°С до 224°С.

Пулегон, используемый в газовой хроматографии, должен выдержать следущее дополнительное испытание.

Количественное определение. Проводят методом газовой хроматографии (2.2.28), как указано в статье *Масло мяты перечной*, используя пулегон в качестве испытуемого раствора.

Площадь основного пика должна быть не менее 98,0% суммы площадей всех пиков.

Рамноза. $C_6H_{12}O_5 \cdot H_2O$. (*М.м.* 182,2). 1074900 [6155-35-7]. L-Рамноза. . 6-Деокси-L-манноза.

Кристалический порошок белого цвета. Легко растворим в воде.

$[a]_D^{20}$: от +7,8° до +8,3°. Определение проводят, используя раствор 50 г/л в *воде Р* содержащей около 0,05%NH_3.

Рапонтицин. $C_{21}H_{24}O_9$. *(М.м.* 420.4). *1075000.* [155-58-8]. 3-Гидрокси-5-[2-(3-гидрокси-4-метоксифенил)этенил]фенил-β-D-глюкопиранозид.

Кристаллический порошок желтовато-серого цвета. Растворим в 96% спирте и метаноле.

Хроматография. Определение проводят, как указано в статье *Корень ревеня;* на полученной хроматограмме должно обнаруживаться только одно основное пятно.

Рапсовое масло. *1074600.*

Жирное масло, полученное выдавливанием из семян различных сортов *Brassiea napus L.*

Фракция жирных кислот содержит от 40% до 55% кислоты эруковой.

Прозрачная жидкость от жёлтого до темно-жёлтого цвета. Практически не растворимо в 96% спирте, смешивается с эфиром и петролейным эфиром.

Йодное число (2.5.4). От 94 до 120.

Число омыления (2.5.6). От 168 до 181.

Перекисное число (2.5.5). Не более 5.

Кислота эруковая. Определение проводят, как указано в испытании на посторонние жирные кислоты методом тонкослойной хроматографии *(2.4.21),* используя следующие растворы:

Раствор А. Растворяют 20 мг смеси жирных кислот в 4 мл *хлороформа Р.*

Раствор В. 2,0 мл раствора А доводят *хлороформом* Р до объёма 50 мл.

На хроматограмме раствора А должно обнаруживаться пять чётких пятен. Пятно с самым низким значением R_f около 0,25 должно быть наиболее интенсивным или одним из наиболее интенсивных и должно соответствовать кислоте эруковой. На хроматограмме раствора В должно быть чётко видно пятно, соответствующее кислоте эруковой.

Растворимый красный. См. *1-Судан. Красный G.*

Резорцин. $C_6H_6O_2$. *(М.м.* 110,1). *1074800.* [108-46-3].

Бензол-1,3-диол. # м-Диоксибензол.

Содержит не менее 98,5% и не более 101,0% $C_6H_6O_2$ в пересчете на сухое вещество.

Кристаллический порошок или кристаллы бесцветные или бледно-розово-серого цвета. Краснеет под действием света и воздуха. Очень легко растворим в воде и 96% спирте, легко растворим в эфире.

Потеря в массе при высушивании (2.2.32). Не более 1,0%. 1,00 г субстанции сушат в эксикаторе в течение 4 ч.

Хранят в плотно укупоренном контейнере, в защищенном от света месте.

Резорцина раствор.

2 г *резорцина Р* растворяют в 10 мл *96% спирта Р*.

Хранят в защищенном от света месте при температуре от 15°С до 25°С не более 7 сут.

Резорцина реактив. *1074801.*
К 80 мл *кислоты хлористоводородной Р* прибавляют 10 мл раствора 20 г/л *резорцина Р,* 0,25 мл раствора 25 г/л *меди (II) сульфата Р* и доводят *водой Р* до объёма 100,0 мл.

Используют через 4 ч после приготовления. Хранят при температуре от 2°С до 8°С.

Срок годности 7 сут.

Рибоза. $C_5H_{10}O_5$. *(М.м.* 150,1). *1109600.* [50-69-1]. D-Рибоза.

Растворима в воде, мало растворима в 96% спирте.

Температура плавления: от 88°С до 92°С.

Рицинолеиновая кислота. $C_{18}H_{34}O_3$. *(М.м.* 298,5). *1100100.* [141-22-0].

12-Гидроксиолеиновая кислота.

Вязкая жидкость от жёлтого до желтовато-коричневого цвета. Содержит смесь жирных кислот, полученных гидролизом масла касторового. Практически нерастворима в воде, очень легко растворима в этаноле, растворима в эфире.

d_{20}^{20}: около 0,942.

n_D^{20}: около 1,472.

Температура плавления: около 285°С с разложением.

Родамин В. $C_{28}H_{31}ClN_2O_3$. *(М.м.* 479.,). *1075100.* [81-88-9]. Показатель Шульца № 864. Цветной индекс №45170. [9-(2-Карбоксифенил)-6-(диэтиламино)-3H-ксантен-3-илиден]диэтиламмония хлорид.

Кристаллы зелёного цвета или порошок красновато-фиолетового цвета. Очень легко растворим в воде и 96% спирте.

Ртуть. Hg. *(А.м.* 200,6). *1052800.* [7439-97-6].

Жидкость серебристо-белого цвета, рассыпающаяся на сферические капли, которые не оставляют металлического следа при трении о бумагу.

d_{20}^{20}: около 13,5.

Температура кипения: около 357°С.

Ртути (II) нитрата раствор. *1052801.*

3 мл *ртути Р* осторожно растворяют в 27 мл *кислоты азотной дымящейся Р,* полученный раствор разводят равным объёмом *воды Р.*

Хранят в защищённом от света месте. Срок годности 2 мес.

Ртуги (II) ацетат. $C_4H_6HgO_4$. *(М.м.* 318,7). *1052000.* [1600-27-7]. Ртути диацетат.

Кристаллы белого цвета. Очень легко растворим в воде, растворим в 96% спирте.

Ртути (II) ацетата раствор. *1052001.*

3,19 г *ртути (II) ацетата Р* растворяют в *кислоте уксусной безводной Р,* доводят объём раствора той же кислотой до 100 мл. Если необходимо, полученный раствор нейтрализуют *0.1 М раствором кислоты хлорной,* используя в качестве индикатора 0,05 *мл раствора кристаллического фиолетового Р.*

Ртути (II) бромид. $HgBr_2$. *(М.м.* 360,4). *1052100.* [7789-47-1]. Ртути дибромид.

Кристаллы или кристаллический порошок белого или светло-жёлтого цвета. Мало растворим в воде, растворим в 96% спирте.

Ртутно-бромидная бумага. *1052101.*

В прямоугольную чашку помещают раствор 50 г/л *ртути (II) бромида Р* в *этаноле Р*, погружают в раствор кусочки белой фильтровальной бумаги, с плотностью 80 г/м^2, (скорость фильтрования, равная времени фильтрования, выраженному в секундах, при фильтровании 100 мл воды при температуре 20°С через фильтр с поверхностью 10 см^2 и постоянном давлении 6,7 кПа: от 40 с до 60 с), размером 1,5 х 20 см, сложенные вдвое. Бумагу подвешивают на неметаллическую нить, позволяя стечь избытку жидкости, сушат в защищённом от света месте. Отрезают по 1 см с каждого конца каждой полоски и нарезают остальную часть бумаги на квадратики со стороной 1,5 см или диски диаметром 1,5 см.

Хранят в контейнере со стеклянной пробкой, завернутом в чёрную бумагу.

Ртути (II) йодид. HgI_2. *(М.м.* 454,4). *1052300.* [7774-29-0]. Ртути дийодид.

Плотный кристаллический порошок ярко-красного цвета. Мало растворим в воде, умеренно растворим в ацетоне, 96% спирте и эфире, растворим в избытке раствора *калия йодида Р*. Ядовит.

Хранят в защищённом от света месте.

Ртути (I) нитрат. $Hg_2(NO_3)_2 \cdot 2H_2O$. *(М.м.* 561,2).

Бесцветные кристаллы. На воздухе выветриваются. Ядовит.

Ртути (II) нитрат. $Hg(NO_3)_2 \cdot H_2O$. *(М.м.* 342,6). *1052400.* [7782-86-7]. Ртути динитрат моногидрат. # Ртути окисной нитрат моногидрат.

Бесцветные или слегка окрашенные кристаллы. Гигроскопичен, растворим в воде в присутствии небольшого количества кислоты азотной.
Хранят *в* воздухонепроницаемом контейнере, в защищённом от света месте.

Ртути (II) оксид. HgO. *(М.м.* 216,6). *1052500.* [21908-53-2]. Ртути оксид жёлтый. Ртути оксид.

Порошок от жёлтого до оранжево-жёлтого цвета. Практически нерастворим в воде и 96% спирте.

Хранят в защищённом от света месте.

Ртути роданид. См. *Ртути (II) тиоцианат.*

Ртути (II) сульфата раствор. *1052600.* [7783-35-9].

1 г *ртути (II) оксида Р* растворяют в смеси 20 мл *воды Р и* 4 мл *кислоты серной Р.*

Ртути (II) тиоцианат. $Hg(SCN)_2$. *(М.м.* 316,7). *1052700.* [592-85-8]. Ртути ди(тиоцианат). Ртути роданид.

Кристаллический порошок белого цвета. Очень мало растворим в воде, мало растворим в 96% спирте и эфире, растворим в растворах натрия хлорида.

Ртути (II) тиоцианата раствор. *1052701.*

0,3 г *ртути (II) тиоцианата Р* растворяют в *этаноле Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 100 мл.

Срок годности 7 сут.

Ртути (II) хлорид. $HgCl_2$. *(М.м.* 271,5). *1052200.* [7487-94-7]. # Сулема.

Содержит не менее 99,5% и не более 100,5% $HgCl_2$ в пересчете на сухое вещество.

Кристаллический порошок белого цвета или белые или бесцветные кристаллы, или тяжелая кристаллическая масса. Растворим в воде, эфире и глицерине, легко растворим в 96% спирте.

Потеря в массе при высушивании (2.2.32). Не более 1,0%. 2,00 г субстанции сушат в *вакууме* продолжительностью 24 ч.

Ртути (II) хлорида раствор. *1052201.*

Раствор 54 г/л.

Рутений красный.
$[(NH_3)_5RuORu(NH_3)_4ORu(NH_3)_5]Cl_6 \cdot 4H_2O$. *(М.м.* 858). *1075200.* [11103-72-3].

Порошок коричневато-красного цвета. Растворим в воде.

Рутения красного раствор. *1075201.*

Раствор 0,8 г/л в *растворе свинца (II) ацетата Р.*

Рутин. $C_{27}H_{30}0_{16}\cdot 3H_2O$. *(М.м.* 665). *1075300.* [153-18-4]. Рутозид. 3-(*О*-6-Деокси-*α* -L-маннопиранозил-(1→6)-β-D-глюкопиранозилокси)-2-(3,4-дигидроксифенил)-5,7-дигидрокси-4Н-хромен-4-он.

Кристаллический порошок жёлтого цвета, темнеет на свету. Очень мало растворим в воде, растворим примерно в 400 частях кипящей воды, мало растворим *в 96%* спирте, практически нерастворим в эфире, растворим в растворах гидроксидов щелочных металлов и аммиака.

Температура плавления: около 210°С с разложением.

Раствор *в 96% спирте Р* имеет два максимума поглощения *(2.2.25)* при длинах волн 259 нм и 362 нм.

Хранят в защищённом от света месте.

Сабинен. $C_{10}H_{16}$. *(М.м.* 136,2). *1109700.* [2009-00-9]. Туй-4(10)-ен. 4-Метилен-1-изопропилбицикло-[3.1.0]гексан.

Бесцветная маслянистая жидкость.

d_{25}^{25}: около 0,843.

n_D^{20}: около 1,468.

Температура кипения: от 163°С до 165°С.

Сабинен, используемый в газовой хроматографии, должен выдерживать следующее дополнительное испытание.

Количественное определение. Проводят методом газовой хроматографии *(2.2.28),* как указано в статье *Масло цветков померанца,* используя сабинен в качестве испытуемого раствора.

Площадь основного пика должна быть не менее 99,0% суммы площадей всех пиков.

Салициловая кислота. $C_7H_6O_3$. *(М.м.* 138,1). *1075600.* [69-72-7].

2-гидроксибензенкарболовая кислота.

Содержит не менее 99,0% и не более 100,5% $C_7H_6O_3$ в пересчете на сухое вещество.

Белый кристаллический порошок или белые бесцветные игольчатые кристаллы. Мало растворима в воде, легко растворима в 96% спирте и эфире, умеренно растворима в метиленхлориде.

Хранят в защищенном от света месте.

Салициловый альдегид. $C_7H_6O_2$. *(М.м.* 122,1). *1075400.* [90-02-8].

2-Гидроксибензальдегид.

Прозрачная, бесцветная, маслянистая жидкость.

d_{20}^{20}: около 1,167.

n_D^{20}: около 1,574.

Температура кипения: около 196°С.

Температура плавления: около -7°С.

Салицилового альдегида азин. $C_{14}H_{12}N_2O_2$. *(М.м.* 240,3). *1075500.*

2,2'-Азинодиметилдифенол.

0,30 г *гидразина сульфата Р* растворяют в 5 мл *воды Р,* прибавляют 1 мл *кислоты уксусной ледяной Р* и 2 мл свежеприготовленного 20% *(об/об)* раствора *салицилового альдегида Р* в *2-пропаноле Р.* Перемешивают, выдерживают до образования жёлтого осадка, затем встряхивают с двумя порциями, по 15 мл каждая, *метиленхлорида Р.*
Объединённые органические извлечения, высушенные над *натрия сульфатом безводным Р,* декантируют или фильтруют и выпаривают досуха. Осадок перекристаллизовывают при охлаждении из смеси растворителей *метанол Р - толуол Р* (40:60). Кристаллы сушат в вакууме.

Температура плавления: около 213°C.

Хроматография. Определение проводят, как указано в статье *Повидон* в испытании на гидразин; на полученной хроматограмме должно обнаруживаться только одно основное пятно.

Сантонин. $C_{15}H_{15}O_3$. *(М.м.* 246,3). *1122000.* (-)-a-Сантонин. 3,5a,9-Триметил-3a,5,5a,9Ь-тетрагидро-3Н,4Н-нафто[1,2]-фуран-2,8-дион.

Бесцветные блестящие кристаллы, желтеющие под действием света. Очень мало растворим в воде, легко растворим в горячем 96% спирте, умеренно растворим в этаноле.

Температура плавления: от 174°С до 176°С.

$[a]_D^{18}$:-173° в этаноле.

Хроматография. Определение проводят, как указано в испытании *Идентификация С* в статье *Цветки арники;* на хроматограмме полученной с 10 мкл раствора, должно обнаруживаться тёмное пятно с R_f около 0,5. Хроматограмму опрыскивают *раствором анисового альдегида Р,* нагревают при температуре 105°С в течение 5-10 мин. На хроматограмме при дневном свете наблюдается пятно первоначально жёлтого цвета, которое затем быстро становится фиолетово-красного цвета.

#Сафранин Т.

Смесь 10-фенил-3,6-диамино-2,7-диметилфеназиния хлорида ($C_{20}H_{19}ClN_4$) и 10-*о*-толил-3,6-диамино-2,7-диметилфеназиния хлорида ($C_{21}H_{21}ClN_4$).

Красно-коричневый порошок. Растворим в воде и 96% спирте. Растворы с 96% спирте красного цвета с желто-красной флюоресценцией. При прибавлении к водному раствору красителя *кислоты хлористоводородной Р* образуетсясине-фиолетовая окраска.

#Сафранина раствор. Приготовляют в двух отдельных контейнерах с притертыми пробками. В первом контейнере 1 г *сафранина Р* растворяют в *растворе спирта (50% об/об) Р*. Во втором контейнере к 100 мл *96% спирта Р* прибавляют две капли раствора *кислоты хлористоводородной (10% об/об) Р* и взбалтывают.

Сахар. См. *Сахароза.*

Сахароза. $C_{12}H_{22}O_{11}$. (*М.м.* 342,3).*1085700.* [57-50-1]. β-D-фруктофуранозил *a* -D-глюкопиранозид. Сахар.

Белый кристаллический порошок или блестящие сухие бесцветные или белые кристаллы. Очень легко растворим в воде, мало растворим в 96% спирте и практически нерастворим в этаноле.

Если сахарозу используют для поверки поляриметра, её хранят в сухом виде в запаянной ампуле.

Свинца (II) ацетат. $C_4H_6O_4Pb \cdot 3H_2O$ *(М.м.* 379?3). *1048100.* [6080-56-4]. Свинца диацетат.

Бесцветные кристаллы, выветривающиеся на воздухе. Легко растворим в воде, растворим в 96% спирте.

Свинцово-ацетатная бумага. *1048102.*

Фильтровальную бумагу, плотность которой 80 г/м^2, погружают в смесь *кислота уксусная разведенная Р - раствор свинца (II) ацетата Р* (1:10), затем её вынимают, сушат и нарезают на полоски размером 15 мм х 40 мм.

Свинцово-ацетатная вата. *1048101.*

Гигроскопичную вату погружают в смесь растворителей *кислота уксусная разведенная Р - раствор свинца (II) ацетата Р (*1:10). Не отжимая ваты, удаляют избыток жидкости, помещают её на несколько слоев фильтровальной бумаги и сушат на воздухе.

Хранят в воздухонепроницаемом контейнере.

Свинца (II) ацетата раствор. *1048103.*

Раствор 95 г/л в *воде, свободной от углерода оксида, Р.*

Свинца (II) ацетата основного раствор. *1048400.* [1335-32-6]. Свинцовый уксус. Содержит не менее 16,7*% (м/м)* и не более 17,4% *(м/м)* Pb *(А.м.* 207,2) в виде соединения соответствующего примерно формуле $C_8H_{14}O_{10}Pb_3$.

40,0 г *свинца (II) ацетата Р* растворяют в 90 *воды, свободной от углерода диоксида, Р.* Доводят pH раствора до 7,5 *раствором натрия гидроксида концентрированным Р,* центрифугируют и используют прозрачный, бесцветный раствор над осадком.

При хранении, в хорошо закрытом контейнере, раствор должен быть прозрачным.

Свинца (II) оксид. PbO. *(М.м.* 223,19).

Мелкокристаллический или аморфный порошок от желто-зеленоватого с серебристым оттенком до красновато-бурого.

Свинца (IV) оксид. PbO_2. *(М.м.* 239,2). *1048200.* [1309-60-0]. Свинца диоксид.

Порошок тёмно-коричневого цвета, выделяющий кислород при нагревании. Практически нерастворим в воде, растворим в кислоте хлористоводородной с выделением хлора, растворим в кислоте азотной разведенной в присутствии пероксида водорода, щавелевой кислоты или других восстанавливающих реагентов, растворим в горячих концентрированных растворах гидроксидов щелочных металлов.

Свинца (II) нитрат. $Pb(NO_3)_2$. *(М.м.* 331,2). *1048300.* [10099-74-8]. Свинца динитрат.

Кристаллический порошок белого цвета или бесцветные кристаллы. Легко растворим в воде.

Свинца (II) нитрата раствор. *1048301.* Раствор 33 г/л.

Свинцовый уксус. См. *Свинца (II) ауетата основного раствор.*

Селен. Se. *(А.м.* 79,0). *1075900.* [7782-49-2].

Порошок или гранулы от коричневато-красного до чёрного цвета. Практически нерастворим в воде и 96% спирте, растворим в кислоте азотной.

Температура плавления: около 220°C.

Селена (IV) оксид. SeO_2. *(М.м.* 110,96).
Белый кристаллический порошок.

Селенистая кислота. H_2SeO_3. *(М.м.* 129,0). *1100200.* [7783-00-8].

Кристаллы, расплывающиеся на воздухе. Легко растворима в воде.

Хранят в воздухонепроницаемом контейнере.

Сеньетова соль. См. *Калия-натрия тартрат.*

Сера. S. (*А.м.* 32,7). *1110800.*

Желтый порошок. Практически нерастворима в воде, растворима в сероуглероде, мало растворима в растительных маслах.

Температура плавления: около 120°С.

Хранят в защищенном от света месте.

Серебра диэтилдитиокарбамат. $C_5H_{10}AgNS_2$. *(М.м.* 256,1). *1110400.* [1470-61-7].

Порошок от бледно-жёлтого до серовато-жёлтого цвета. Практически нерастворим в воде, растворим в пиридине.

Готовят следующим образом. 1,7 г *серебра нитрата Р* растворяют в 100 мл *воды Р.* Отдельно растворяют 2,3 г *натрия диэтилдитиокарбамата Р* в 100 мл *воды Р.* Оба раствора охлаждают до температуры 10°С, затем их смешивают и при перемешивании собирают осадок жёлтого цвета на стеклянном фильтре, промывают 200 мл холодной *воды Р* и сушат в вакууме в течение 2-3 ч.
Серебра диэтилдитиокарбамат не должен изменять окраску или иметь сильный запах.

Серебра нитрат. $AgNO_3$. *(М.м.* 169,9). *1078300.* [7761-88-8].

Содержит не менее 99,0% и не более 100,5% $AgNO_3$.

Кристаллический порошок белого цвета или прозрачные, бесцветные кристаллы. Очень легко растворим в воде, растворим в 96% спирте.

Хранят в неметаллическом контейнере, в защищенном от света месте.

Серебра нитрата аммиачный раствор. *1078303.*

2,5 г *серебра нитрата Р* растворяют в 80 мл *воды Р,* по каплям прибавляют *раствор аммиака разведенный Р1* до растворения осадка и доводят объём раствора *водой Р* до 100 мл.

Готовят непосредственно перед использованием.

Серебра нитрата раствор Р1. *1078301.* Раствор 42.5 г/л.

Хранят в защищённом от света месте.

Серебра нитрата раствор Р2.*1078302.*

Раствор 17 г/л.

Хранят в защищённом от света месте.

Серебра нитрата раствор в пиридине. *1078304.*

Раствор 85 г/л в *пиридине Р.*

Хранят в защищённом от света месте.

Серебра нитрата реактив. *1078305.*

К смеси 3 мл *раствора аммиака концентрированного Р* и 40 мл *1 М раствора натрия гидроксида* прибавляют по каплям при перемешивании 8 мл раствора 200 г/л *серебра нитрата Р* и доводят объём раствора *водой Р до* 200 мл.

Серебра оксид. Ag_2O. *(М.м.* 231,7). *1078400.* [20667-12-3]. Дисеребра оксид.

Порошок коричневато-чёрного цвета. Практически нерастворим в воде и 96% спирте, легко растворим в разведенной кислоте азотной и растворах аммиака.

Хранят в защищённом от света месте.

Серебряно-марганцевая бумага. *1078200.*

Полоски медленно фильтрующей бумаги погружают в раствор, содержащий 8,5 *г/л марганца (II) сульфата Р* и 8,5 г/л *серебра нитрата Р.* Выдерживают в течение нескольких минут, сушат над *фосфора (V) оксидом Р,* защищая от воздействия паров кислот и щелочей.

Серин. $C_3H_7NO_3$. *(М.м.* 105,1). *1076000.* [56-45-1]. (*S*)-2-амино-3-гидроксипропановая кислота.

Белый или почти белый кристаллический порошок или бесцветные кристаллы. Легко растворим в воде, практически нерастворим в 96% спирте и эфире.

Содержит не менее 98,5% и не более 101,0% $C_3H_7NO_3$ в пересчете на сухое вещество.

Хранят в защищенном от света месте.

Серная кислота. H_2SO_4. *(М.м.* 98,1). *1086800.* [7664-93-9].

Содержит не менее 95,0% *(м/м)* и не более 97,0% *(м/м)* H_2S0_4.

Бесцветная, едкая, маслянистой консистенции, очень гигроскопичная жидкость. Смешивается с водой и 96% спиртом с интенсивным выделением тепла.

d_{20}^{20}: от 1,834 до 1,837.

Раствор 10 г/л является сильной кислотой и даёт реакцию на сульфаты *(2.3.1).*

Прозрачность (2.2.1). Кислота серная должна быть прозрачной.

Цветность (2.2.2, метод II). Кислота серная должна быть бесцветной.

Окисляющиеся вещества. Осторожно при охлаждении 20 г кислоты серной прибавляют к 40 мл *воды Р*, прибавляют 0,5 мл *0,002 М раствора калия перманганата;* фиолетовая окраска должна сохраняться не менее 5 мин.

Хлориды. Не более 0,00005% (0.5 ppm). Осторожно при охлаждении 10 г кислоты серной прибавляют к 10 мл *воды Р,* охлаждают и доводят объём раствора тем же растворителем до 20 мл. Прибавляют 0,5 *мл раствора серебра нитрата Р2* и выдерживают в течении 2 мин в защищённом от света месте. Полученный раствор должен выдерживать испытание на хлориды. Эталон готовят с использованием 1 мл эталонного *раствора хлорида* (5ppm CL) *Р*, 19 мл *воды Р* и 0,5 мл *раствора серебра нитрата Р2.*

Нитраты. Не более 0,00005% (0.5 ppm). Осторожно при охлаждении 50 г или 27,2 мл кислоты серной прибавляют к 15 мл *воды Р,* затем прибавляют 0,2 мл свежеприготовленного раствора 50 г/л *бруцина Р в кислоте уксусной ледяной Р.* Через 5 мин окраска полученного раствора должна быть не интенсивнее окраски эталонного раствора, приготовленного аналогично испытуемому с использованием 12,5 *мл воды Р,* 50 г *кислоты серной, свободной от азота, Р,* 2,5

мл *эталонного раствора нитрата (10 ppm NO_3) Р* и 0,2 мл раствора 50 г/л *бруцина Р* в *кислоте уксусной ледяной Р.*

Аммоний. Не более 0,0002% (2 ppm). Осторожно при охлаждении 2,5 г кислоты серной прибавляют к *воде Р,* доводят объём раствора тем же растворителем до 20 мл, охлаждают и по каплям прибавляют 10 мл раствора 200 г/л *натрия гидроксида Р* и 1 мл *щелочного раствора калия тетрайодомеркурата Р;* окраска раствора должна быть не интенсивнее окраски эталонного раствора, приготовленного с использованием 5 мл *эталонного раствора аммония (1 ppm NH_4) Р,* 15 мл *воды Р,* 10 мл раствора 200 г/л *натрия гидроксида Р* и 1 мл *щелочного раствора калия тетрайодомеркурата Р.*

Мышьяк (2.4.2, метод А). Не более 0,000002% (0,02 ppm). Осторожно при охлаждении к 50 г кислоты серной прибавляют 3 мл *кислоты азотной Р,* осторожно упаривают до объёма 10 мл, охлаждают, к полученному остатку прибавляют 20 мл *воды Р* и упаривают до объёма 5 мл. Раствор должен выдерживать испытание на мышьяк. Эталон готовят с использованием 1,0 мл *эталонного раствора мышьяка (1 ppm As) Р.*

Тяжёлые металлы (2.4.8, метод А). Не более 0,0002% (2 ppm). 10 мл раствора, приготовленного для испытания на железо, доводят *водой Р* до объёма 20 мл. 12 мл полученного раствора должны выдерживать испытание натяжелые металлы. Эталон готовят с использованием *эталонного раствора свинца (2 ppm Pb) Р.*

Железо (2.4.9). Не более 0,0001% (1 ppm). Зольный остаток, полученный при определении остатка после прокаливания, растворяют при слабом нагревании в 1 мл *кислоты хлористоводородной разведенной Р* и доводят объём раствора *водой Р* до 50,0 мл. 5 мл полученного раствора доводят *водой Р* до объёма 10 мл. Раствор должен выдерживать испытание на железо.

Остаток после прокаливания. Не более 0,0001%. Определение проводят из 100 г кислоты серной, путём осторожного выпаривания в небольшом тигле над открытым пламенем и нагревания остатка до красного каления.

Количественное определение. В колбу с притёртой стеклянной пробкой помещают 30 мл *воды Р*, точно взвешивают, прибавляют 0,8 мл кислоты серной, охлаждают и снова взвешивают. Титруют *1 М раствором натрия гидроксида*, используя в качестве индикатора 0,1 мл *раствора метилового красного Р*.

1 мл *1 М раствора натрия гидроксида* соответствует 49,04 мг H_2SO_4.

Хранят в контейнере с притёртой стеклянной пробкой, изготовленном из стекла или другого инертного материала.

Серная кислота разведённая. 1086804

Содержит 98 г/л H_2SO_4.

5,5 мл *кислоты серной Р* прибавляют к 60 мл *воды Р*, охлаждают и доводят объём раствора тем же растворителем до 100 мл.

Количественное определение. В колбу с притёртой стеклянной пробкой помещают 30 мл *воды Р*, прибавляют 10,0 мл кислоты серной разведённой и титруют *1 М раствором натрия гидроксида*, используя в качестве индикатора 0,1 мл *раствора метилового красного Р.*

1 мл *1 М раствора натрия гидраксида* соответствует 49,04 мг H_2So_4.

Серная кислота, свободная от азота. 1086806.

Должна выдерживать требования для *кислоты серной Р* и следущие дополнительное испытание.

Нитраты. К 5 мл *воды Р* осторожно прибавляют 45 мл кислоты серной, охлаждают до температуры 40°С и прибавляют 8 мг *дифенилбензидина Р*; полученный раствор должен быть бледно-розового или слегка бледно-голубого цветка.

Серной кислоты 2,5 М раствор спиртовой. 1086801.

Осторожно при постоянном охлаждении и перемешивании 14 мл *кислоты серной Р* прибавляют к 60 мл *этанола Р*, охлаждают и доводят объём раствора *этанолом Р* до 100 мл.
Готовят непосредственно перед использованием.

Серной кислоты раствор спиртовой. 1086803.
Осторожно при постоянном охлаждении и перемешивании 20 мл *кислоты серной Р* прибавляют к 60 мл *96% спирта Р*, охлаждают и доводят объём раствора *96% спиртом Р* до 100 мл.
Готовят непосредственно перед использованием.

Сероводород. H_2S. (*М.м.* 34,08) 1044000 [7783-06-4]
Газ; мало растворим в воде.

Сероводород Р1 H_2S. (*М.м.* 34,08) 1106600
Содержит не менее 99, 7% (об/об) H_2S.

Сероуглерод. См. *Углерода диоксид.*

Серы диоксид. SO_2. (*М.м.* 64.1) 1086700. [7446-09-5]. Сернитсый ангидрид.
Бесцветный газ. При сжатии превращается в бесцветную жидкость.

Серы диоксид Р1. SO_2. (*М.м.* 64,1) 1110900
Содержит не менее 99,9% (об/об) SO_2.

О-Сиаловая кислота. См. *N-Ацетилнеураминовая кислота.*

Силикагель G. 1076300 [112926-00-8]
Содержит около 13% кальция сульфата полугидрата
Мелкий гомогенный порошок белого цвета, с размером частиц около 15 мкм.
Кальция сульфат. 0,25 г помещают в колбу с притёртой стеклянной пробкой, прибавляют 3 мл *кислоты хлористоводородной разведённой Р* и 100 мл *воды Р*, энергично взбалтывают в течение 30 мин, фильтруют через стеклянный фильтр и промывают остаток. Фильтрат и промывные воды объединяют и проводят определение содержания кальция методом комплексометрии (2.5.11).
1 мл *0,1 М раствора натрия эдетата* соответствует 14,51 мг $CaSO_4 \cdot 1/2H_2O$.
pH (2.2.3). Около 7. Измеряют pH суспензии, полученной взбалтыванием 1 г с 10 мл *воды, свободной от углерода диоксида, Р* в течении 5 мин.

Силикагель GF_{254}. *1076400.* [112926-00-8].

Содержит около 13% кальция сульфата полугидрата и около 1,5% флуоресцентного индикатора, имеющего оптимальную интенсивность поглощения при длине волны 254 нм.

Мелкий гомогенный порошок белого цвета с размером частиц около 15 мкм.

Кальция сульфат. Определение проводят методом, указанным для *силикагеля GP.*

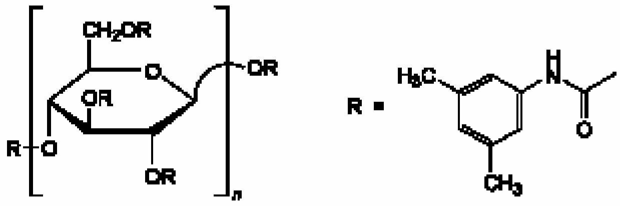
pH (2.2.3). Должен выдерживать требования для *силикагеля GP.*

Флуоресценция. Определение проводят методом тонкослойной хроматографии *(2.2.27),* используя в качестве тонкого слоя *силикагель G.* На хроматографическую пластинку наносят в десять точек последовательно возрастающие объемы от 1 мкл до 10 мкл раствора 1 г/л *кислоты бензойной Р* в смеси растворителей *кислота*

муравьиная безводная Р — 2-пропанол Р (10:90). Хроматографируют в той же смеси растворителей. Когда фронт растворителей пройдёт около 10 см, пластинку сушат и просматривают в УФ-свете при длине волны 254 нм. На верхней трети хроматограммы на флуоресцирующем фоне должны обнаруживаться тёмные пятна кислоты бензойной, начиная от 2 мкг и более.

Силикагель OD для хиральных разделений. 110300.

Силикагель для хроматографии очень мелкий, тонко измельченный с размером частиц 5 мкм, покрытый следующим продуктом замещения:



Силикагель Н. *1076500.* [112926-00-8].

Мелкий гомогенный порошок белого цвета с размером частиц около 15 мкм.

pH (2.2.3). Должен выдерживать требования для *силикагеля GP.*

Силикагель Н силанизированный. *1076600.*

Приготовление тонкого слоя. См. *силикагель HF_{254} силанизированный Р.*

Мелкий гомогенный порошок белого цвета; после встряхивания с водой всплывает на поверхность вследствие гидрофобных свойств. *Хроматографическая разделяющая способность.* Должен выдерживать испытание для *силикагеля HF_{254} силанизированного Р.*

Силикагель HF_{254}. *1076700.*

Содержит около 1,5% флуоресцентного индикатора, имеющего оптимальную интенсивность поглощения при длине волны 254 нм.

Мелкий гомогенный порошок белого цвета с размером частиц около 15 мкм.

pH (2.2.3). Должен выдерживать требование для *силикагеля GP.*

Флуоресценция. Должен выдерживать требование для *силикагеля GF_{254} Р.*

Силикагель HF_{254} силанизированный. *1076800.*

Содержит около 1,5% флуоресцентного индикатора, имеющего оптимальную интенсивность поглощения при длине волны 254 нм.

Мелкий гомогенный порошок белого цвета; после встряхивания с водой всплывает на поверхность вследствие гидрофобных свойств.

Приготовление тонкого слоя. 30 г энергично встряхивают с 60 мл смеси растворителей *метанол Р - вода* Р (1:2) в течение 2 мин. Тщательно очищенные пластинки покрывают слоем толщиной 0,25 мм, используя устройство для нанесения. Пластинки с покрытием сушат на воздухе, затем нагревают при температуре от 100°C до 105°C в течение 30 мин.

Хроматографическая разделяющая способность. В коническую колбу вместимостью 250 мл помещают по 0,1 г *метиллаурата Р, метилмиристата Р, метилпальмитата Р и метилстеарата Р,* прибавляют 40 мл *раствора калия гидроксида спиртового Р и* нагревают с обратным холодильником на водяной бане в течение 1 ч. Охлаждают, переносят раствор в делительную воронку с помощью 100 мл *воды Р,* подкисляют (pH от 2 до 3) *кислотой хлористоводородной разведенной Р* и встряхивают с тремя порциями *хлороформа Р по* 10 мл каждая. Объединённые хлороформные извлечения сушат над *натрия сульфатом безводным Р,* фильтруют и выпаривают досуха на водяной бане. Остаток

растворяют в 50 мл *хлороформа Р.* Проводят определение методом тонкослойной хроматографии *(2.2.27),* используя в качестве тонкого слоя силикагель HF_{254} силанизированный. На хроматографическую пластинку наносят в три точки по 10 мкл хлороформного раствора и хроматографируют в системе растворителей *кислота уксусная ледяная Р - вода Р — диоксин Р* (10:25:65). Когда фронт растворителей пройдёт 14 см, пластинку сушат при температуре 120°С в течение 30 мин, охлаждают, опрыскивают раствором 35 г/л *кислоты фосфорномолибденовой Р* в *2-пропаноле Р и* нагревают при температуре 150°С до появления пятен. Пластинку обрабатывай парами аммиака до получения белого фона. На хроматограммах должны обнаруживаться четыре чётко разделённых хорошо выраженных пятна.

Силикагель для хроматографии. *1076900.*

Силикагель очень тонко измельченный с размером частиц от 3 мкм до 10 мкм. Размер частиц указывают после названия сорбента в испытаниях, в которых он используется.

Мелкий гомогенный порошок белого цвета. Практически нерастворим в воде и 96% спирте

Силикагель аминогексадецилсилильный для хроматографии. *1138400.*

Силикагель очень тонко измельченный с размером частиц от 3 мкм до 10 мкм и поверхностью, химически модифицированной аминогексадецилсилильными группами. Размер частиц указывают после названия сорбента в испытаниях, в которых он используется.

Мелкий гомогенный порошок белого цвету. Практически нерастворяется у воде и 96% спирте.

Силикагель для хроматографии, сильный аниои *1077800.*

Силикагель очень тонко измельченный с размером частиц от 3 мкм до 10 мкм и поверхностью, химически модифицированной группами четвертичного аммония. Размер частиц указывают после названия сорбента в испытаниях, в которых он используется.

Мелкий гомогенный порошок белого цвета. Практически нерастворим в воде и 96% спирте.

pH: используемые пределы от 2 до 8.

Силикагель для эксклюзионной хроматографии. | *1077900.*

Силикагель очень тонко измельченный с размером частиц 10 мкм и очень гидрофильной поверхностью. Средний диаметр пор около 30 нм. Он совместим с водными растворами с pH от 2 до 8 и органическими растворителями. Пригоден для разделения протеинов с молекулярными массами от $1{\cdot}1O^3$ до $З{\cdot}10^5$.

Силикагель, модифицированный амилазой, для хроматографии. *1109800.*

Силикагель очень тонко измельченный с размером частиц 10 мкм и поверхностью, химически модифицированной амилазой. Размер частиц указывают после названия сорбента в испытаниях, в которых он используется.

Мелкий гомогенный порошок белого цвета.

Практически нерастворим в воде и 96% спирте.

Силикагель аминопропилметилсилильный для хроматографии. *1102400.*

Силикагель очень тонко измельченный с размером частиц от 3 мкм до 10 мкм и поверхностью, химически модифицированной аминопропилметилсилильными группами. Размер частиц указывают после названия сорбента в испытаниях, в которых он используется.

Мелкий гомогенный порошок белого цвета. Практически нерастворим в воде и 96% спирте.

Силикагель аминопропилсилильный для хроматографии. *1077000.*

Силикагель очень тонко измельченный с размером частиц от 3 мкм до 10 мкм и поверхностью, химически модифицированной аминопропилсилильными группами. Размер частиц указывают после названия сорбента в испытаниях, в которых он используется.

Мелкий гомогенный порошок белого цвета. Практически нерастворим в воде и 96% спирте.

Силикагель безводный. *1076100.* [112926-00-8].

Аморфная кремневая кислота, частично обезвоженная и полимеризованная, поглощающая при температуре 20°C около 30% воды относительно своей массы. Содержит в качестве индикатора кобальта хлорид. Практически нерастворим в воде, частично растворим в растворах натрия гидроксида.

Силикагель бутилсилильный для хроматографии. *1076200.*

Силикагель очень тонко измельченный с размером частиц от 3 мкм до 10 мкм и поверхностью, химически модифицированной бутилсилильными группами. Размер частиц указывают после названия сорбента в испытаниях, в которых он используется.

Мелкий гомогенный порошок белого цвета.

Практически нерастворим в воде и 96% спирте.

Кремния диоксид сфероидальный: 30 нм.

Объем пор: 0,6 $см^3$/г.

Удельная площадь поверхности: 80 $м^2$/г.

Силикагель гексилсилильный для хроматографии. *1077100.*

Силикагель очень тонко измельченный с размером частиц от 3 мкм до 10 мкм и поверхностью, химически модифицированной гексилсилильными группами.

Размер частиц указывают после названия сорбента в испытаниях, в которых он используется.

Мелкий гомогенный порошок белого цвета. Практически нерастворим в воде и 96% спирте.

Силикагель гидрофильный для хроматографии. *1077200.*

Силикагель очень тонко измельченный с размером частиц от 3 мкм до 10 мкм, поверхность которого модифицирована с целью придания гидрофильных свойств. Размер частиц указывают после названия сорбента в испытаниях, в которых он используется.

Силикагель диметилоктадецилсилильный для хроматографии. *1115100.*

Силикагель очень тонко измельченный с размером частиц от 3 мкм до 10 мкм и поверхностью, химически модифицированной диметилоктадецилсилильными группами. Размер частиц указывают после названия сорбента в испытаниях, в которых он используется.

Мелкий гомогенный порошок белого цвета. Практически нерастворим в воде и 96% спирте. Размер частиц иррегулярный.

Удельная площадь поверхности: 300 $м^2$/г.

Силикагель диольный для хроматографии. 1110000.

Сферические частицы кремния диоксида с привитыми дигидроксипропильными группами. Размер пор 10 нм.

Силикагель нитрильный для хроматографии. *1077300.*

Силикагель очень тонко измельченный с поверхностью, химически модифицированной цианопропилсилильными группами. Размер частиц указывают после названия сорбента в испытаниях, в которых он используется.

Мелкий гомогенный порошок белого цвета. Практически нерастворим в воде, 96% спирте и эфире.

Силикагель нитрильный для хроматографии Р1. *1077400.*

Силикагель очень тонко измельченный, состоящий из пористых сферических частиц, с химически связанными нитрильными группами. Размер частиц указывают после названия сорбента в испытаниях, в которых он используется.

Мелкий гомогенный порошок белого цвета. Практически нерастворим в воде, 96% спирте и эфире.

Силикагель нитрильный для хроматографии Р2. *1077400.*

Силикагель сверхчистый с поверхностью, химически модифицированной цианопропилсилильными группами. Содержит менее 20 ppm металлов. Размер частиц указывают после названия сорбента в испытаниях, в которых он используется.

Мелкий гомогенный порошок белого цвета. Практически нерастворим в воде, 96% спирте и эфире.

Силикагель октадеканоиламинопропилсилильный для хроматографии. *1115200.*

Силикагель тонко измельченный с размером частиц от 3 мкм до 10 мкм и поверхностью, химически модифицированной аминопропилсилильными группами, которые ацелированы октадеканоил-группами. Размер частиц указывают после названия сорбента в испытаниях, в которых он используется.

Мелкий гомогенный порошок белого цвета. Практически нерастворим в воде и 96% спирте.

Силикагель октадецилсилильный для хроматографии. *1077500.*

Силикагель очень тонко измельченный с размером частиц от 3 мкм до 10 мкм и поверхностью, химически модифицированной октадецилсилильными группами. Размер частиц указывают после названия сорбента в испытаниях, в которых он используется.

Мелкий гомогенный порошок белого цвета. Практически нерастворим в воде и 96% спирте.

Силикагель октадецилсилильный для хроматографии Р1. *1110100.*

Силикагель сверхчистый, очень тонко измельченный с размером пор около 10 нм и поверхностью, химически модифицированной октадецилсилильными группами (содержание углерода 19%).

Содержание металлов должно быть менее 20 ppm.

Силикагель октадецилсилильный для хроматографии Р2. *1115300.*

Силикагель сверхчистый, очень тонко измельченный с размером пор 15 нм и поверхностью, химически модифицированной октадецилсилильными группами (содержание углерода 20%), предназначенный для анализа полициклических ароматических углеводородов. Размер частиц указывают после названия сорбента в испытаниях, в которых он используется.

Мелкий гомогенный порошок белого цвета. Практически нерастворим в воде и 96% спирте.

Силикагель октадецилсилильный, деактивированный по отношению к основаниям, для хроматографии. *1077600.*

Силикагель очень тонко измельченный с размером частиц от 3 мкм до 10 мкм; перед введением октадецилсилильных групп его предварительно обрабатывают путем тщательного промывания и гидролиза большинства поверхностных силоксановых мостиков для сведения к минимуму взаимодействия с основными компонентами. Размер частиц указывают после названия сорбента в испытаниях, в которых он используется.

Мелкий гомогенный порошок белого цвета. Практически нерастворим в воде и 96% спирте.

Силикагель октадецилсилильный, деактивирован-ный по отношению к основаниям, эндкепированный для хроматографии. *1108600.*

Силикагель очень тонко измельченный с размером частиц от 3 мкм до 10 мкм и размером пор около 10 нм, содержит около 16% углерода. Перед введением октадецилсилильных групп его предварительно обрабатывают путем тщательного промывания и гидролиза большинства поверхностных силоксановых мостиков. Для дальнейшего сведения к минимуму какого-либо взаимодействия с основными соединениями тщательно эндкепируют для устранения большинства оставшихся силанольных групп. Размер частиц указывают после названия сорбента в испытаниях, в которых он используется.

Мелкий гомогенный порошок белого цвета. Практически нерастворим в воде и 96% спирте.

Силикагель октадецилсилильный эндкепированный для хроматографии. *1115400.*

Силикагель очень тонко измельченный с размером частиц от 3 мкм до 10 мкм и поверхностью, химически модифицированной октадецилсилильных группами. Для сведения к минимуму взаимодействия с основными соединениями тщательно эндкепируют для устранения большинства оставшихся силанольных групп. Размер частиц указывают после названия сорбента в испытаниях, в которых он используется.

Мелкий гомогенный порошок белого цвета. Практически нерастворим в воде и 96% спирте.

Силикагель октилсилильный для хроматографии. *1077700.*

Силикагель очень тонко измельченный с размером частиц от 3 мкм до 10 мкм и поверхностью, химически модифицированной октилсилильными группами. Размер частиц указывают после названия сорбента в испытаниях. В которых он используется.

Мелкий гомогенный порошок белого цвета. Практически нерастворим в воде и 96% спирте.

Силикагель октилсилильный для хроматографии Р1. 1077701

Силикагель очень тонко измельчённый с размером частиц от 3 мкм до 10 мкм и поверхностью, химически модифицированной октилсилильными и метильными группами. Размер частиц указывают после названия сорбента в испытаниях, в которых он используется.

Мелкий гомогенный порошок белого цвета. Практически не растворим в воде и 96% спирте.

Силикагель октилсилильный для хроматографии Р2. 1077702.

Силикагель сверхчистый, очень тонко измельчённый с размером пор 10 нм и поверхностью, химически модифицированной октилсилильными группами (содержит 19% углерода). Содержание металлов должно быть менее 20 ppm.

Силикагель октилсилильный эндкепированный для хроматографии. 1119600.

Силикагель очень тонко измельченный с размером частиц от 3 мкм до 10 мкм и поверхностью, химически модифицированной октилсилильными группами. Для сведения к минимуму взаимодействия с основными соединениями тщательно эндкепируют для устранения большинства силанольных групп. Размер частиц указывают после названия сорбента в испытаниях, в которых он используется.

Мелкий гомогенный порошок белого цвета. Практически нерастворим в воде и 96% спирте.

Силикагель триметилсилильный для хроматографии. *1115500.*

Силикагель очень тонко измельченный с размером частиц от 3 мкм до 10 мкм и поверхностью, химически модифицированной тримецилсилильными группами. Размер частиц указывают после цазвания сорбента в испытаниях, в которых он используется.

Мелкий гомогенный порошок белого цвета. Практически нерастворим в воде и 96% спирте.

Силикагель фенилсилильный для хроматографии. *1110200.*

Силикагель очень тонко измельченный с размером частиц от 5 мкм до 10 мкм и поверхностью, химически модифицированной фенильными группами.

Силикагель фенилсилильный для хроматографии Р1. *1075700.*

Силикагель тонко измельченный с размером частиц 5 мкм и поверхностью, химически модифицированной фенильными группами. Размер частиц указывают после названия сорбента в испытаниях, в которых он используется.

Мелкий гомогенный порошок белого цвета. Практически нерастворим в воде, 96% спирте и метиленхлориде.

Кремния диоксид сфероидальный: 8 нм.

Удельная площадь поверхности: 180м^2/г.

Содержание углерода: 5,5%.

Силикагель цианосилильный для хроматографии. *1109900.*

Силикагель очень тонко измельченный с поверхностью, химически модифицированной цианосилильными группами. Размер частиц указывают после названия сорбента в испытаниях, в которых он используется.

Мелкий гомогенный порошок белого цвета. Практически нерастворим в воде и 96% спирте.

Синенсетин. $C_{20}H_{20}O_7$. *(М.м.* 372). *1110500.* [2306-27-6].

3',4',5,6,7-Пентаметоксифлавон.

Сквалан. $C_{30}H_{62}$. *(М.м.* 422,8). *1084900.* [111-01-3].

2,6,10,15,19,23-Гексаметилтетракозан.

Бесцветная маслянистая жидкость. Легко растворим в эфире и жирных маслах, мало растворим в ацетоне, 96% спирте, кислоте уксусной ледяной и метаноле.

d_{20}^{20}: от 0,811 до 0,813.

n_D^{20}: от 1,451 до 1,453.

Смесь для спекания. 25 г мелко растертого *натрия карбоната безводного Р* тщательно смешивают в ступке с 45 г высушенного *калия карбоната Р* и с 25 г мелко растертого *калия нитрата Р*. Хранят в контейнере с притертой пробкой.

Смола слабокатионитная. *1096000. См. Анионообменная смола Р.*

Смола ионообменная сильнокислотная. *1085400.* См. *Ионообменная смола сильнокислотная.*

Сплав Деварда. Сплав *меди Р*, *алюминия Р* и *цинка Р* в соотношении 1:0,9:0,1. Белый хрупкий металл в виде палочек или серого порошока.

Сополимер стирол-дивинилбензола. *1085500.*

Твёрдые, пористые гранулы из поперечно-сшитого полимера. Существуют различные марки с разными размерами гранул. Размер гранул указывают после названия реактива в испытаниях, в которых он используется.

Сополимер этилвинилбензол-дивинилбензола. *1036900.*

Твёрдые, пористые гранулы шарообразной формы из поперечно-сшитого полимера. Существуют различные марки с разными размерами гранул. Размер гранул указывают в испытаниях, в которых он используется.

Сополимер этилвинилбензол-дивинилбензола Р1. *1036901.*

Твёрдые, пористые гранулы шарообразной формы из поперечно-сшитого полимера, с номинальной удельной площадью поверхности от 500 $м^2/г$ до 600 $м^2/г$ и средним размером пор 7.5 нм. Существуют различные марки с разными размерами гранул. Размер гранул указывают в испытаниях, в которых он используется.

Сорбит. $C_6H_{14}0_6$. *(М.м.* 182,2). *1084800.* [50-70-4]. D-глюцитол(D-сорбитол). Сорбитол.

Содержит не менее 97,0% и не более 102,0% $C_6H_{14}0_6$ в пересчете на безводное вещество.

Белый или почти белый кристаллический порошок очень легко растворим в воде и практически нерастворим в 96% спирте. Проявляет полиморфизм.

Вода (2.5.12). Не более 1,5%. Определяют из навескит 1,00 г полумикрометодом.

Сорбитол. См. *Сорбит.*

96% спирт. C_2H_60. *(М.м.* 46,07). *1002500.* [64-17-5]. См. статью *96% спирт этиловый.*

96% спирт, свободный от альдегидов. *1002501.*

1200 мл *96% спирта Р* смешивают с 5 мл раствора 400 г/л *серебра нитрата Р* и 10 мл охлажденного раствора 500 г/л *калия гидроксида Р,* встряхивают, отстаивают в течение нескольких дней и фильтруют.

Фильтрат перегоняют непосредственно перед использованием.

Спирт (Х процентов, *об/об).* *1002502.*

Для получения раствора, содержание спирта в котором соответствует величине *X,* смешивают соответствующие объемы *воды Р и 96% спирта Р,* учитывая эффекты нагревания и уменьшения объёма, сопровождающие приготовление такой смеси.

Стеариновая кислота. $C_{18}H_{36}O$. *(М.м.* 284,5). *1085200.* [57-11-4]. Октадекановая кислота.

Порошок или хлопья белого цвета. Маслянистая на ощупь, практически нерастворима в воде, растворима в горячем 96% спирте и эфире.

Температура плавления: около 70°C.

Стрептомицина сульфат. $C_{42}H_{78}N_{14}O_{24} \cdot 3H_2SO_4$. *(М.м.* 1457). *1085300.* [3810-74-0].

Бис[*N,N'*-бис(аминоиминометил)-4-*O*[5-деокси-2-*O*[2-деокси-2-(метиламино)-*α* -L-глюкопиранозил]-3-*C*-*α* -L-ликсофуранозил]-D-стрептомина]трисульфат.

Стептомицина сульфат – антибиотик продуцируемый плесневыи штамами *Streptomyces griseus* или полученный другими способами. Могут быть добавлены стабилизаторы. Антимикробная активность должна быть не менее 720 ЕД/мг, в пересчете на сухое вещество.

Порошок белого или почти белого цвета. Гигроскопичен. Очень легко растворим в воде, практически нерастворим в этаноле и эфире.

Потеря в массе при высушивании (2.2.32). Не более 7,0%. 1,000 г субстанции сушат над *фосфором (V) оксидом Р* при температуре 60°C и давлении не более 0,1 кПа продолжительностью 24 ч.

Хранят в воздухонепроницаемом контейнере. Если субстанция стерильна, ее хранят в стерильном, воздухонепроницаемом контейнере с контролем первого вскрытия.

Стронция карбонат. $SrCO_3$. *(М.м.* 147,6). 1122700 [1633-05-2].

Содержит не менее 99,5% $SrCO_3$

Кристаллический порошок белого цвета.

Судан красный G.$C_{17}H_{14}N_2O_2$. *(М.м.* 278,3). *1085800.* Показатель Шульца №149. Цветной индекс №12150. Растворимый Красный 1.

1-[(2-Ме ксифенил)азо]нафталин-2-ол.

Порошок красновато-коричневого цвета. Практически нерастворим в воде.

Хроматография. Определение проводят методом тонкослойной хроматографии *(2.2.27),* используя в качестве тонкого слоя *силикагель G Р.* На хроматографическую пластинку наносят 10 мкл рас раствора 0,1 г/л в *метиленхлориде Р* и хроматографируют в том же растворителе. Длина пробега фронта растворителя около 10 см от линии старта. На полученной хроматограмме должно обнаруживаться только одно основное пятно.

Судан оранжевый. $C_{16}H_{12}N_2O$. *(М.м.* 248,3). 777070 [842-07-9]. Цветной индекс № 12055. 1-(Фенилазо)нафталин-2-ол. Судан I.

Порошок оранжево-красного цвета. Практичеки нерастворим в воде, растворим в метиленхлориде.

Температура плавления: около 131°C.

Судан I. См. *Судан оранжевый.*

Судан III. $C_{22}H_{16}N_4O$. *(М.м.* 352,40).

Коричневый порошок с зеленым металлическим блеском. Нерастворим в воде, растворим в хлороформе, кислоте уксусной, трудно растворим в 96% спирте, эфире, жирных и эфирных маслах.

Судана III раствор. 0,01 г *судана III Р* растворяют в 5 мл *96% спирта Р* и прибавляют 5 мл *глицерина Р*.

Сулема. См. *Ртути (II) хлорид.*

Сульфаминовая кислота. H_3NO_3S. *(М.м.* 97,1 *1085900.* [5329-14-6].

Кристаллический порошок или кристаллы белого цвета. Легко растворима в воде, умеренно растворима в ацетоне, 96% спирте и метаноле практически нерастворима в эфире.

Температура плавления: около 205°С с разложением.

Сульфаниламид. $C_6H_8N_2O_2S$. *(М.м.* 172.2). *1086100.* [63-74-1].

4-Аминобензолсульфонамид.

Порошок белого цвета. Мало растворим в воде, легко растворим в кипящей воде, ацетоне, разведенных кислотах и растворах гидроксидов щелочных металлов, умеренно растворим в 96% спирте, эфире и петролейном эфире.

Температура плавления: около 165°С.

Сульфаниловая кислота. $C_6H_7NO_3S$. *(М.м.* 173,2).1 *1086200.* [121-57-3].

4-Аминобензолсульфонов кислота.
Бесцветные кристаллы. Умеренно растворима воде, практически нерастворима в 96%. спирте

Сульфаниловой кислоты раствор. *1086203.*
0,33 г *сульфаниловой кислоты Р*, при необходимости, бережно нагревая, растворяют в 75 мл *воды Р* и доводят объем раствора *кислотой уксусной ледяной Р* до 100 мл.

Сульфановый синий. $C_{27}H_{31}N_2NaO_6S_2$. *(М.м.* 566,6). *1086000.* [129-17-9]. Показатель Шульца №769. Цветной индекс №42045. Дисульфин синий. Кислотный синий 1. Синий VS. Натрия [[[4-(диэтиламино)фенил](2,4-дисульфонатофенил)метилен]циклогекса-2,5-диен-1-илиден]диэтиламмоний.

Порошок фиолетового цвета. Растворим в воде. Разведенные растворы имеют синюю окраску, которая переходит в жёлтую при прибавлении кислоты хлористоводородной концентрированной.

Сульфатиазол. $C_9H_9N_3O_2S_2$. *(М.м.* 255,3). *1086300.* [72-14-0].

4-Амино-N-(тиазол-2-ил)бензолсульфонамид.

Порошок или кристаллы белого или желтовато-белого цвета. Очень мало растворим в воде, растворим в ацетоне, мало растворим в 96% спирте. Растворяется в разведенных минеральных кислотах, растворах гидроксидов и карбонатов щелочных металлов.

Температура плавления: около 200°С.

Сульфомолибденовый реактив Р2. *1086400.*

Около 50 мг *аммония молибдата Р* растворяют в 10 мл *кислоты серной Р.*

Сульфомолибденовый реактив Р3. *1086500.*

2,5 г *аммония молибдата* Р растворяют при нагревании в 20 мл *воды Р.* 28 мл *кислоты серной Р* разводят *водой Р* до объёма 50 мл, затем охлаждают. Оба раствора смешивают и доводят объём раствора *водой Р до* 100 мл.

Хранят в полиэтиленовом контейнере.

Сульфосалициловая кислота. $C_7H_6O_6S{\cdot}2H_2O$. *(М.м.* 254,2). *1086600.* [5965-83-3].

2-Гидрокси-5-сульфобензойная кислота.

Кристаллический порошок или кристаллы белого цвета. Очень легко растворима в воде и 96% спирте, растворима в эфире.

Температура плавления: около 109°С.

Сурьмы (III) хлорид. $SbCl_3$. *(М.м.* 228,1). *1007700.* [10025-91-9]. Сурьмы трихлорид.

Бесцветные кристаллы или прозрачная кристаллическая масса. Гигроскопичен, легко растворим в этаноле. Сурьмы хлорид гидролизуется водой.

Хранят в воздухонепроницаемом контейнере, защищают от влаги.

Сурьмы (III) хлорида раствор. *1007701.*

30 г *сурьмы (III) хлорида Р* быстро промывают двумя порциями, по 15 мл *каждая, хлороформа, свободного от этанола, Р;* отбрасывают промывные растворы и тотчас промытые кристаллы растворяют при слабом нагревании в 100 мл *хлороформа, свободного от этанола, Р.*

Хранят раствор над несколькими граммами *натрия сульфата безводного Р.*

Сурьмы (III) хлорида раствор Р1. *1007702.*

Раствор I. 1,110 г *сурьмы (III) хлорида Р* растворяют в 400 мл *этиленхлорида Р,* прибавляют 2 г *алюминия оксида безводного Р,* перемешивают и фильтруют через стеклянный фильтр (40). Доводят объем фильтрата *этиленхлоридом Р до* 500,0 мл и перемешивают. Оптическая плотность *(2.2.25)* полученного раствора, измеренная при длине волны 500 нм в кювете с толщиной слоя 2 см, не должна превышать 0,07.

Раствор II. В вытяжном шкафу смешивают 100 мл свежеперегнанного *ацетилхлорида Р и* 400 мл *этиленхлорида Р.*

Хранят в прохладном месте.

Смешивают 90 мл раствора I и 10 мл раствора II.

Хранят во флаконах оранжевого стекла с притёртой пробкой. Срок годности 7 сут. Реактив не годен при появлении окрашивания.

Суспензия эритроцитов кролика. *1074500.*

1,6% *(об/об)* суспензию эритроцитов кролика готовят следующим образом: удаляют фибрин из 15 мл свежеотобранной крови кролика, встряхивая со стеклянными шариками, затем центрифугируют с ускорением 2000g в течение 10 мин и промывают эритроциты тремя порциями, по 30 мл каждая, раствора 9 г/л *натрия хлорида Р.* 1.6 мл суспензии эритроцитов доводят смесью растворителей *фосфатный буферный раствор рН 7,2 Р* - раствор 9 г/л *натрия хлорида Р (*1:9) до объёма 100 мл.

Тагатоза.$C_6H_{12}O_6$. *(М.м.* 180,16). *1111000.* [87-81-0]. *D-ликсо-* Гексулоза.

Порошок белого цвета.

$[\alpha]_D^{20}$: -2,3°. Определение проводят, используя раствор 21,9 г/л в *воде Р.*

Температура плавления: от 134°С до 135°С.

Таллия сульфат. Tl_2SO_4. *(М.м.* 504,8). *1089100.* [7446-18-6]. Диталлия сульфат.

Ромбовидные призмы белого цвета. Мало растворим в воде, практически нерастворим в 96% спирте.

Тальк. *1087000.* [14807-96-6].

Чистый тальк имеет формулу $Mg_3Si_4O_{10}(OH)_2$. *М.м.* 379,3.

Легкий гомогенный белый или почти белый порошок, скользкий на ощупь. Практически нерастворим в воде, 96% спирте, в разведенных растворах кислот и щелочных гидроксидов.

Таниновая кислота. *1087100.* [1401-55-4]. Дубильная кислота.

Блестящие чешуйки или аморфный порошок от желтоватого до светло-коричневого цвета. Очень легко растворима в воде, легко растворима в 96% спирте, растворима в ацетоне, практически нерастворима в эфире.

Хранят в защищённом от света месте.

Твин 80. См. *Полисорбат 80.*

Теофиллин. $C_7H_8N_4O_2$. *(М.м.* 180,2). *1089300.* [58-55-9]. 1,3-диметил-3,7-дигидро-1*Н*-пурин-2,6-дион.

Содержит не менее 99,0% и не более 101,0% $C_7H_8N_4O_2$ в пересчете на сухое вещество.

Белый кристаллический порошок. Мало растворим в воде, умеренно растворим в этаноле, растворяется в растворах щелочных гидроксидов, аммиака и минеральных кислот.

Температура плавления: от 270°С до 274°С (после высушивания при температуре 100°С-105°С)..

ɣ-Терпинен. $C_{10}H_{16}$. *(М.м.* 136,2). *1115900.* [99-85-4].

1-Изопропил-4-метилциклогекса-1,4-диен.

Маслянистая жидкость.

d_4^{15}: около 0,850.

n_D^{15}: от 1,474 до 1,475.

Температура кипения: от 183°C до 186°C.

g -Терпинен, используемый в газовой хроматографии, должен выдерживать следующее дополнительное испытание.

Количественное определение. Проводят методом газовой хроматографии *(2.2.28),* как указано в статье *Масло мяты перечной.*

Испытуемый раствор. Испытуемое вещество.

Площадь основного пика должна быть не менее 93,0% суммы площадей всех пиков.

Терпинен-4-ол. $C_{10}H_{18}O$. *(М.м.* 154,2). *1116000.* [562-74-3].

4-Метил-1-(1-метилэтил)циклогекс-3-ен-1 -ол. n-Мент-1 -ен-4-ол.

Бесцветная маслянистая жидкость.

d_{20}^{20}: около 0,934.

n_D^{20}: около 1,477.

Температура кипения: от 209°C до 212°C.

Терпинен-4-ол, используемый в газовой хроматографии, должен выдерживать следующее дополнительное испытание.

Количественное определение. Проводят методом газовой хроматографии *(2.2.28),* как указано в статье *Масло лавандовое.*

Испытуемый раствор. Испытуемое вещество.

Площадь основного пика должна быть не менее 98,0% суммы площадей всех пиков.

α-Терпинеол. $C_{10}H_{18}O$. *(М.м.* 154,2). *10873* [98-55-5].

(RS)-2-(4-Метилциклогекс-3-енил)-1 пропанол.

Бесцветные кристаллы. Практически нерастворим в воде, растворим в 96% спирте и эфире.

d_{20}^{20}: около 0,935.

n_D^{20}: около 1,483.

$[a]_D^{20}$: около 92,5°.

Температура плавления: около 35°С.

Может содержать от 1% до 3% b -терпинеола.

a -Терпинеол, используемый в газовой хроматографии, должен выдерживать следующее испытание.

Количественное определение. Проводят методом газовой хроматографии *(2.2.28),* как указано статье *Масло анисовое.*

Испытуемый раствор. 100 г/л в *гексане Р.*

Площадь основного пика должна быть не менее 97,0% суммы площадей всех пиков, за исключением пика гексана.

Тестостерон. $C_{19}H_{28}O_2$. *(М.м.* 288,4). *1116100.* [58-22-0].

17 b -гидроксиандрост-4-ен-3-он.

Содержит не менее 97,0% и не более 103,0% $C_{19}H_{28}O_2$ в пересчете на сухое вещество.

Белый кристаллический порошок или бесцветные или желтовато-белые кристаллы. Практически нерастворим в воде, легко растворим в спирте, метиленхлориде, практически нерастворим в жирных маслах.

Температура плавления: около 150°С.

Хранят в защищенном от света месте.

Тестостерона пропионат. $C_{22}H_{32}O_3$. *(М.м.* 344,5). *1087400.* [57-85-2]. 3-оксоандрост-4-ен-17 b -ил пропаноат.

Содержит не менее 97,0% и не более 103,0 $C_{22}H_{32}O_3$ в пересчете на сухое вещество.

Белый или почти белый порошок или бесцветные кристаллы. Практически нерастворим в воде, легко растворим в ацетоне, 96% спирте и метаноле, растворим в жирных маслах.

Температура плавления: от 119°С до 123°С.

Хранят в защищенном от света месте.

Тетрабутиламмония бромид. $C_{16}H_{36}BrN$ *(М.м.* 322,4). 1087500. [1643-19-2].

Кристаллы белого или почти белого цвета.

Температура плавления: от 102°С до 104°С.

Тетрабутиламмония гидроксид. $C_{16}H_{37}NO \cdot 30H_20$. *(М.м.* 800). *1087800.* [2052-49-5].

Содержит не менее 98,0% $C_{l6}H_{37}NO \cdot 30H_20$.

Кристаллы белого или почти белого цвета. Растворим в воде.

Количественное определение. 1,000 г растворяют в 100 мл *воды Р* и тотчас титруют *0,1 М раствором кислоты хлористоводородной* потенциометрически *(2.2.20).* Параллельно проводят контрольный опыт.

1 мл 0,1 М раствора кислоты хлористоводородной соответствует 80,0 мг $C_{16}H_{37}NO \cdot 30H_2O$.

Тетрабутиламмония гидроксида раствор (104 г/л*).* *1087801.* [2052-49-5].

Раствор, содержащий 104 г/л $C_{16}H_{37}NO$ *(М.м.* 259,5), приготовленный разведением реактива соответствующей степени чистоты.

Тетрабутиламмония гидроксида раствор (400 г/л). *1087802.* [2052-49-5}.

Раствор, содержащий 400 г/л $C_{16}H_{37}NO$ *(М.м.* 259,5), приготовленный разведением реактива соответствующей степени чистоты.

Тетрабутиламмония гидросульфат. $C_{16}H_{37}NO_4S$. (*М.м*. 339,5). *1087700.* [32503-27-8].

Кристаллический порошок или бесцветные кристалы. Легко растворим в воде и метаноле.

Температура плавления: от 169°С до 173°С.

Оптическая плотность (2.2.25). Не более 0,05. Измеряют оптическую плотность раствора 50 г/л в области длин волн от 240 нм до 300 нм.

Тетрабутиламмония дигидрофосфат. $C_{16}H_{38}NO_4P$. *(М.м.* 339,5). *1087600.* [5574-97-0].

Порошок белого цвета, гигроскопичен.

pH *(2.2.3).* Около 7,5. Измеряют pH раствора 170 г/л.

Оптическая плотность (2.2.25). Около 0,10. Измеряют оптическую плотность раствора 170 г/л при длине волны 210 нм.

Хранят в воздухонепроницаемом контейнере.

Тетрабутиламмония йодид. $C_{16}H_{36}IN$. *(М.м.* 369,4). *1087900.* [311-28-4].

Содержит не менее 98,0% $C_{16}H_{36}IN$.

Кристаллический порошок или кристаллы белого цвета или слегка окрашены. Растворим в 96% спирте.

Сульфатная *зола (2.4.14).* Не более 0,02%.

Количественное определение. 1,200 г растворяют в 30 мл *воды Р,* прибавляют 50,0 мл *0,1 М раствора серебра нитрата* и 5 мл *кислоты азотной разведённой Р.* Титруют избыток серебра нитрата *0,1 М раствором аммония тиоцианата,* используя в качестве индикатора 2 мл раствора *железа (III) аммония сульфата Р2.*

1мл *0,1 М раствора серебра нитрата* соответству 36,94мг $C_{16}H_{36}IN$.

Тетрагептиламмония бромид. $C_{28}H_{60}BrN$. *(М.м.* 490,7). *1088400.* [4368-51-8].

Кристаллический порошок или кристаллы белого цвета или слегка окрашены.

Температура плавления: от 89°С до 91°С.

Тетрагептиламмония гидросульфат. $C_{24}H_{53}NO_4S$. *(М.м.* 451,8). *1116300.* [32503-34-7].

Температура плавления: от 100°C до 102°C.

Тетрагидрофуран. C_4H_8O. *(М.м.* 72,1). *1088500.* [109-99-9]. Тетраметиленоксид.

Прозрачная, бесцветная, воспламеняющаяся жидкость. Смешивается с водой, 96% спиртом и эфиром.

d_{20}^{20}: около 0,89.

Не перегоняют, если тетрагидрофуран не выдерживает испытание на пероксиды.

Пероксиды. 8 мл *раствора крахмала с калия йодидом Р* помещают в цилиндр с притёртой пробкой вместимостью 12 мл и диаметром около 1,5 см, заполняют полностью тетрагидрофураном, затем перемешивают и выдерживают в тёмном месте в течение 30 мин. Не должно наблюдаться окрашивания.

Тетрагидрофуран, используемый в спектрофотометрии, должен выдерживать следующее дополнительное испытание.

Минимальное пропускание (2.2.25). Определение проводят, используя в качестве компенсационной жидкости *воду Р:*

20% при длине волны 255 нм,

80% при длине волны 270 нм,

98% при длине волны 310 нм.

Тетрадекан. $C_{14}H_{30}$. *(М.м.* 198,4). *1088200.* [629-59-4]. н-Тетрадекан.

Содержит не менее 99,5% $C_{14}H_{30}$.

Бесцветная жидкость.

d_{20}^{20}: около 0,76.

n_D^{20}: около 1,429.

Температура кипения: около 252°C.

Температура плавления: около -5°C.

Тетрадециламмония бромид. $C_{40}H_{84}BrN$. *(М.м.* 659). *1088300.* [14937-42-9]. Тетракис(децил)аммония бромид.

Кристаллический порошок или кристаллы белого цвета или слегка окрашены.
Температура плавления: от 88°C до 89°C.

Тетразолиевый синий. $C_{40}H_{32}Cl_2N_8O_2$. *(М.м.* 728). *1089000.* [1871-22-3]. 3,3'-(3,3'-Диметокси[1,1-бифенил]-4,4'-диил)бис[2,5-дифенил-2Н-тетразолий]дихлорид.

Кристаллы жёлтого цвета. Мало растворим в воде, легко растворим в 96% спирте и метаноле, практически нерастворим в ацетоне и эфире.

Температура плавления: около 245°C с разложением.

Тетраметиламмония гидроксид. $C_4H_{13}NO \cdot 5H_2O$. *(М.м.* 181,2). *1122800.* Тетраметиламмония гидроксид пентагидрат.

Квалификация - для ВЭЖХ.

Тетраметиламмония гидроксида раствор. *1088600.* [75-59-2].

Содержит не менее 10,0*% (м/м)* $C_4H_{13}NO$ *(М.м.* 91,2).

Прозрачная, бесцветная или слегка окрашенная жидкость. Смешивается с водой и 96% спиртом.

Количественное определение. К 1,000 г прибавляют 50 мл *воды Р* и титруют *0,05 М раствором кислоты серной,* используя в качестве индикатора 0,1 *мл раствора метилового красного Р.*

1 мл *0,05 М раствора кислоты серной* соответствует 9,12 мг $C_4H_{13}NO$.

Тетраметиламмония гидроксида раствор разведенный. *1088601.*

10 мл *раствора тетраметиламмония гидроксида Р* доводят *96% спиртом, свободным от альдегидов, Р до* объёма 100 мл.

Готовят непосредственно перед использованием.

Тетраметиламмония гидросульфат. $C_4H_{13}NO_4S$. *(М.м.* 171,2). *1116400.* [80526-82-5].

Гигроскопичный порошок. Температура плавления: около 295°C.

Тетраметиламмония хлорид. $C_4H_{12}ClN$. *(М.м.* 109,6). *1100400.* [75-57-0].

Бесцветные кристаллы. Растворим в воде и 96% спирте.

Температура плавления: около 300°C с разложением.

Тетраметилдиаминодифенилметан. $C_{17}H_{22}N_2$. *(М.м.* 254,4). *1088700.* [101-61-1]. 4,4'-Метилен-бис-(N,N-диметиланилин).

Кристаллы от белого до голубовато-белого цвета или листочки. Практически нерастворим в воде, мало растворим в 96% спирте, растворим в минеральных кислотах, легко растворим в эфире.

Температура плавления: около 90°C.

Тетраметилдиаминодифенилметана реактив. *1088701.*

Раствор А. 2,5 г *тетраметилдиаминодифенилметана Р* растворяют в 10 мл *кислоты уксусной ледяной Р* и прибавляют 50 мл *воды Р.*

Раствор В. 5 г *калия йодида Р* растворяют в 100 мл *воды Р.*

Раствор С. 0,30 г *нингидрина Р* растворяют в 10 мл *кислоты уксусной ледяной Р* и прибавляют 90 мл *воды Р.*

Растворы А и В смешивают, к полученному раствору прибавляют 1,5 мл раствора С.

Тетраметилсилан. $C_4H_{12}Si$. *(М.м.* 88,2). *1088900.* [75-76-3]. TMS.

Прозрачная, бесцветная жидкость. Очень мало растворим в воде, растворим в ацетоне и 96% спирте.

d_{20}^{20}: около 0,64.

n_D^{20}: около 1,358.

Температура кипения: около 26°C.

Тетраметилсилан, используемый в спектроскопии ядерного магнитного резонанса, должен выдерживать следующее дополнительное испытание.

В спектре ЯМР примерно 10% *(об/об)* раствора тетраметилсилана в *дейтерированном хлороформе Р* интенсивность любого постороннего сигнала, за исключением тех, которые соответствуют вращению боковых связей и хлороформу, не должна превышать интенсивности боковых линий С-13, расположенных на расстоянии 59,1 Гц по обе стороны основного сигнала тетраметилсилана.

Тетраметилэтилендиамин. $C_6H_{16}N_2$. *(М.м.* 116,2). *1088800.* [110-18-9]. *N,N,N',N'*-Тетраметилэтилендиамин.

Бесцветная жидкость. Смешивается с водой, 96% спиртом и эфиром.

d_{20}^{20}*:* около 0,78.

n_D^{20} : около 1,418.

Температура кипения: около 121°С.

Тетрахлорэтан. $C_2H_2Cl_4$. *(М.м.* 167,9). *1088000.* [79-34-5]. 1,1,2,2-Тетрахлорэтан.

Прозрачная, бесцветная жидкость. Мало растворим в воде, смешивается с 96% спиртом и эфиром.

d_{20}^{20} : около 1,59.

n_D^{20} : около 1,495.

Температурные пределы перегонки (2.2.11). От 145°С и 147°С; должно перегоняться не менее 95%.

Тетраэтиламмония гидроксида раствор. $C_8H_{21}NO$. *(М.м.* 147,3). *1100300.* [77- 98-5].

Раствор 200 г/л; бесцветная жидкость, является сильной щелочью.

d_{20}^{20} : около 1,01.

n_D^{20} : около 1,372.

Квалификация - для ВЭЖХ.

Тетраэтиламмония гидросульфат. $C_8H_{21}NO_4S$. *(М.м.* 227,3). *1116200.* [16873-13-5].

Гигроскопичный порошок.

Температура плавления: около 245°С.

Тетраэтиленпентамин. $C_8H_{23}N_5$. *(М.м.* 189,3). *1102000.* [112-57-2].

3,6,9-Триазаундекан-1,11-диамин.

Бесцветная жидкость. Растворим в ацетоне.

n_D^{20} : около 1,506.

Хранят в сухом и прохладном месте.

Тиамазол. $C_4H_6N_2S$.*(М.м.* 114,2). *1089400.* [60-56-0]. Метимазол.

1-Метил-1Н-имидазол-2-тиол.

Кристаллический порошок белого или почти белого цвета. Легко растворим в воде, растворим в 96% спирте и метиленхлориде, умеренно растворим в эфире.

Температура плавления: около 145°С.

2-(2-Тиенил)уксусная кислота. $C_6H_6O_2S$. *(М.м.* 142,1). *1089500.* [1918-77-0].

Порошок коричневого цвета.

Температура плавления: около 65°С.

Тиле реактив. 20 г *натрия гипофосфита Р* растворяют в 40 мл *воды Р*. Раствор вливают в 180 мл *кислоты хлористоводородной Р* и оставляют на 24 ч. По осаждении выделившихся кристаллов натрия хлорида жидкость сливают с осадка.

Раствор должен быть бесцветным. Хранят в стеклянном контейнере с притертой пробкой.

Тимин. $C_5H_6N_2O_2$. *(М.м.* 126,1). *1090400.* [65-71-4].

5-Метилпиримидин-2,4(1H,3H)-дион.

Короткие игольчатые кристаллы или пластинки. Мало растворим в холодной воде, растворим в горячей воде, растворим в разведенных растворах гидроксидов щелочных металлов.

Тимол. $C_{10}H_{14}O$. *(М.м.* 150,2). *1090500.* [89-83-8]. 5-метил-2(метилэтил)фенол

Бесцветные кристаллы. Очень легко растворим в воде, очень легко растворим в спирте, эфире, легко растворим в эфирных и жирных маслах, умеренно растворим в глицерине, растворяется в разведенных растворах щелочных гидроксидов.

Температура плавления: от 48°C до 52°C.

Тимол, используемый в газовой хроматографии, должен выдерживать следующее дополнительное испытание.

Количественное определение. Проводят методом газовой хроматографии *(2.2.28),* как указано в статье *Масло мяты перечной.*

Испытуемый раствор. 0,1 г в 10 мл *ацетона Р.*

Площадь основного пика должна быть не менее 95,0% суммы площадей всех пиков, за исключением пика ацетона.

Хранят в защищенном от света месте.

Тимола раствор.

2 г *тимола Р* растворяют в 10 мл *96% спирта Р*.

Хранят в защищенном от света месте при температуре от 15°C до 25°C не более 7 сут.

Тимоловый синий. $C_{27}H_{30}O_5S$. *(М.м.* 466,6). *1090600.* [76-61-9]. Тимолсульфонфталеин. 4,4'-(3H-2,1-Бензоксатиол-3-илиден)бис[2-изопропил-5-метилфенол]-S,S-диоксид.

Кристаллический порошок от коричневато-зелёного до зеленовато-синего цвета. Мало растворим в воде, растворим в 96% спирте и разведенных растворах гидроксидов щелочных металлов.

Тимолового синего раствор. *1090601.*

0,1 г *тимолового синего Р* растворяют в смеси 2,15 мл *0,1 М раствора натрия гидроксида* и 20 мл *96% спирта Р,* доводят объем раствора *водой Р до* 100 мл.

Испытание на чувствительность. К 100 мл *воды, свободной от углерода диоксида, Р* прибавляют 0,1 мл раствора тимолового синего и 0,2 мл *0,02 М раствора натрия гидроксида;* появляется синее окрашивание, которое переходит в жёлтое при прибавлении не более 0,1 мл *0,02 М раствора кислоты хлористоводородной.*

Изменение окраски. От красной до жёлтой в интервале pH 1,2 –2,8. От оливково-зелёной до синей в интервале pH 8,0 – 9,6.

Тимолфталеин. $C_{28}H_{30}O_4$. *(М.м.* 430,5). *1090700.* [125-20-2].

3,3-Бис(4-гидрокси-5-изопропил-2-метилфенил)-3H-изобензофуран-1 -он.

Порошок от белого до желтовато-белого цвета. Практически нерастворим в воде, растворим в 96% спирте и разведенных растворах гидроксидов щелочных металлов.

Тимолфталеина раствор. *1090701.*

Раствор 1 г/л в *96% спирте Р.*

Испытание на чувствительность. К 100 мл *воды, свободной от углерода диоксида, Р* прибавляют 0,2 мл раствора тимолфталеина, раствор бесцветный; при прибавлении не более 0,05 *мл 0,1 М раствора натрия гидроксида* должно появиться синее окрашивание раствора.

Изменение окраски. От бесцветной до синей в интервале pH 9,3-10,5.

Тиоацетамид. C_2H_5NS. *(М.м.* 75,1). *1089600.* [62-55-5].

Кристаллический порошок или бесцветные кристаллы. Легко растворим в воде и 96% спирте.

Температура плавления: около 113°С.

Тиоацетамида раствор. *1089602.* Раствор 40 г/л.

Тиоацетамида реактив. *1089601.*

К 0,2 мл *раствора тиоацетамида Р* прибавляют 1 мл смеси 5 мл *воды Р,* 15 мл *1 М раствора натрия гидроксида* и 20 мл *глицерина (85%) Р,* нагревают на водяной бане в течение 20 с.

Готовят непосредственно перед использованием.

Тиобарбитуровая кислота. $C_4H_4N_2O_2S$. *(М.м.* 144,2). *1111200.* [504-17-6].

4,6-Дигидрокси-2-сульфанилпиримидин.

Тиогликолевая кислота. $C_2H_4O_2S$. *(М.м.* 92,1). *1089700.* [68-11-1].

2-Меркаптоуксусная кислота.

Бесцветная жидкость. Смешивается с водой, растворима в 96% спирте.

Тиомерсал. $C_9H_9HgNaO_2S$. *(М.м.* 404,8). *1089800* [54-64-8]. Натрия меркуротиолат. Натрия 2-[(этилмеркурио)тио]бензоат.

Лёгкий кристаллический порошок желтовато-белого цвета. Очень легко растворим в воде, легко растворим в 96% спирте, практически нерастворим в эфире.

Тиомочевина. CH_4N_2S. *(М.м.* 76,1). *1089900.* [62-56-6].

Кристаллический порошок или кристаллы белого цвета. Растворима в воде и 96% спирте.

Температура плавления: около 178°С.

Тирамин. $C_8H_{11}NO$. *(М.м.* 137.2). *1117600.* [51-67-2]. 4-(2-Аминоэтил)фенол.

Кристаллы. Мало растворим в воде, растворим в горячем этаноле.

Температура плавления: от 164°С до 165°С.

Тирозин. $C_9H_{11}NO_3$. (*М.м.* 181,2). *1094800.* [60-18-4].

2-Амино-3-(4-гидроксифенил)пропионовая кислота.

Кристаллический порошок или кристаллы белого цвета, или бесцветные кристаллы. Растворим в воде, практически нерастворим в ацетоне, этаноле и

эфире, растворим в кислоте хлористоводородной разведенной и растворах гидроксидов щелочных металлов.

Хроматография. Определение проводят, как указанно в статье *Леводопа;* на полученной хроматограмме должно обнаруживаться только одно основное пятно.

Титан. Ti. *(А.м.* 47,88). *1091000.* [7440-32-6].

Содержит не менее 99% Ti.

Металлический порошок или тонкая проволока, диаметром не более 0.5 мм, или губка.

Температура плавления: около 1668°С.

Плотность: около 4,507 г/см^3.

Титана диоксид. TiO_2. *(М.м.* 79,9). *1117900.* [13463-67-7].

Содержит не менее 98,0% и не более 100,5% TiO_2.

Белый или почти белый порошок. Практически нерастворим в воде, нерастворяется в разведенных минеральных кислотах, но медленно растворяется в горячей концентрированной кислоте серной.

Титана (III) хлорид. $TiCl_3$. *(М.м.* 154,3). *1091200.* [7705-07-9]. Титана трихлорид.

Кристаллы красновато-фиолетового цвета, расплывающиеся на воздухе. Растворим в воде и 96% спирте, практически нерастворим в эфире.

Температура плавления: около 440°С.

Хранят в воздухонепроницаемом контейнере.

Титана (III) хлорида раствор. *1091201.*

Раствор 150 г/л в растворе 100 г/л (HCl) кислоты хлористоводородной.

d_{20}^{20} :около 1,19.

Титана (III) хлорид и кислоты серной реактив. *1091202.*

20 мл *раствора титана (III) хлорида Р* осторожно смешивают с 13 мл *кислоты серной Р,* прибавляют достаточное количество *раствора водорода пероксида концентрированного* Р до получения жёлтого окрашивания, нагревают до начала выделения белых паров и охлаждют. Разводят *водой Р,* повторяют выпаривание и прибавление *воды* Р до получения бесцветного раствора, доводят объём раствора *водой Р до 100 мл*.

Титановый жёлтый. $C_{28}H_{19}N_5Na_2O_6S_4$. *(М.м.* 696). 1090900. [1829-00-1]. Показатель Шульца №280. Цветной индекс № 19540. Тиазоловый жёлтый. Динатрия 2,2'-[(1-триазен-1,3-диил)ди-4,1-фенилен]бис-[6-метилбензотиазол-7-сульфонат].

Порошок желтовато-коричневого цвета. Легко растворим в воде и 96% спирте.

Титанового жёлтого бумага. *1090901.*

Полоски фильтровальной бумаги погружают в р*аствор титанового жёлтого Р,* выдерживают несколько минут и сушат при комнатной температуре.

Титанового жёлтого раствор. *1090902.*

Раствор 0,5 г/л.

Испытание на чувствительность. К 10 мл *воды Р* прибавляют 0,1 мл раствора титанового жёлтого, 0,2 мл *эталонного раствора магния (10ppm Mg) Р и* 1,0 мл 1 *М раствора натрия оксида.* Полученный раствор сравнивают с эталонным раствором, приготовленным таким же образом, за исключением магния; Должно наблюдаться отчетливое розовое окрашивание.

Тозиларгинина метилового эфира гидрохлорид. $C_{14}H_{23}ClN_4O_4S$. *(М.м.* 378,9). *1092000.* [1784-03-8]. N-Тозил-L-аргинин метилового эфира гидрохлорид.Этил-(S)-5-гуанидино-2-(4-метилбензол-сульфонамидо)валерата гидрохлорид.

$[a]_D^{20}$: от -12° до -16°. Определение проводят, используя раствор 40 г/л.

Температура плавления: около 145°С.

Тозиларгинина метилового эфира гидрохлорида раствор. *1092001.*

К 98,5 мг *тозиларгинина метилового эфира гидрохлорида Р* прибавляют 5 мл *буферного раствора трис(гидроксиметил)аминометана pH 8,1 Р,* встряхивают до растворения, прибавляют 2,5 мл *смешанного раствора метилового красного Р* и доводят объём раствора *водой Р до* 25,0 мл.

Тозил-лизил-хлорметана гидрохлорид. $C_{l4}H_{22}Cl_2N_2O_3S$. *(М.м.* 369,3). *1092100.* [4238-41-9]. /V-Тозил-L-лизил-хлорметана гидрохлорид. (3S)-7-Амино-1 -хлор-3-(4-метилбензолсульфонамидо)гептан-2-он гидрохлорид.

$[a]_D^{20}$: от -7° до -9°. Определение проводят, используя раствор 20 г/л.

Температура плавления: около 155°С с разложением.

$A_{1см}^{1\%}$: от 310 до 340. Определение проводят при длине волны 230 нм, используя в качестве компенсационной жидкости *воду Р.*

Тозилфенилаланилхлорметан. $C_{17}H_{l8}ClNO_3S$. *(М.м.* 351,9). *1092200.* [402-71-1].

N-Тозил-L-фенилаланилхлорметан.

$[a]_D^{20}$: от -85° до -89°. Определение проводят, используя раствор 10 г/л в *96% спирте Р.*

Температура плавления: около 105°С.

$A_{1см}^{1\%}$: от 290 до 320. Определение проводят при длине волны 228,5 нм в 96% *спирте Р.*

о-Толидин. $C_{14}H_{16}N_2$. *(М.м.* 212,3). *1123000.* [119-93-7]. 3,3'-Диметилбензидин.

Содержит не менее 97,0% $C_{14}H_{16}N_2$.

Кристаллический порошок светло-коричневого цвета.

Температура плавления: около 130°С.

о-Толидина раствор. *1123001.*

0,16 г *о-толидина Р* растворяют в 30,0 мл *кислоты уксусной ледяной Р,* прибавляют 1,0 *г калия йодида Р и* доводят объём раствора *водой Р* до 500,0 мл.

Торин. См. *Нафтарзон.*

о-Толуидин.C_7H_9N. (*М.м.* 107,2). *1091700.* [95-53-4]. 2-Метил анилин.

Жидкость бледно-жёлтого цвета, под действием воздуха и света становится красновато-коричневой. Мало растворим в воде, растворим в 96% спирте и разведенных кислотах.

d_{20}^{20}: около 1,01.

n_D^{20}: около 1,569.

Температура кипения: около 200°С.

Хранят в воздухонепроницаемом контейнере, в защищённом от света месте.

n-Толуидин. C_7H_9N. *(М.м.* 107,2). *1091800.* [106-49-0]. 4-Метиланилин.

Блестящие пластинки или хлопья. Мало растворим в воде, легко растворим в ацетоне и 96% спирте, растворим в эфире.

Температура плавления: около 44°С.

о-Толуидина гидрохлорид. $C_7H_{10}ClN$. *(М.м.* 143,6). *1117300.* [636-21-5].

2-Метиланилина гидрохлорид. 2-Метилбензоламина гидрохлорид.

Содержит не менее 98,0% $C_7H_{10}ClN$.

Температура плавления: от 215°С до 217°С.

Толуидиновый синий. $C_{15}H_{16}ClN_3S$. *(М.м.* 305,8). *1091900.* [92-31-9]. Показатель Шульца №1041. Цветной индекс №52040. Толуидиновый синий О.

3-Амино-7-диметиламино-2-метилфенотиазина-5 хлорид.

Порошок темно-зелёного цвета. Растворим в воде, мало растворим в 96% спирте.

Толуол. C_7H_8. (*М.м.* 92,1). *1091300.* [108-88-3]. Метилбензол.

Прозрачная, бесцветная, воспламеняющаяся жидкость. Очень мало растворим в воде, смешивается с 96% спиртом.

d_{20}^{20}: от 0,865 до 0,870.

Температура кипения: около 110°С.

Толуол, свободный от серы. *1091301.*

Должен выдерживать требования для *толуола Р* и следующее дополнительное испытание.

Серосодержащие соединения. К 10 мл толуола прибавляют 1 мл *этанола Р,* 3 мл *раствора калия плюмбита Р* и кипятят с обратным холодильником в течение 15 мин. Через 5 мин водный слой не должен потемнеть.

Вещества, родственные тиофену. 2 мл толуола встряхивают с 5 мл *реактива изатина Р* в течение 5 мин и оставляют на 15 мин; в нижнем слое не должно наблюдаться синее окрашивание.

о-Толуолсульфонамид. $C_7H_9NO_2S$. *(М.м.* 171,2). *1091400.* [88-19-7].

2-Метилбензолсульфонамид.

Кристаллический порошок белого цвета. Мало растворим в воде и эфире, растворим в 96% спирте и растворах гидроксидов щелочных металлов.

Температура плавления: около 156°С.

n-Толуолсульфонамид. *1091500.* См. *Толуолсульфонамид.*

Толуолсульфонамид. $C_7H_9NO_2S$. *(М.м.* 171,2) *1091500.* [70-55-3].

4-Метилбензолсульфонамид. n-Толуолсульфонамид.

Кристаллический порошок белого цвета, растворим в воде и эфире, растворим в 96% спирте и растворах гидроксидов щелочных металл^

Температура плавления: около 136°С.

Хроматография. Определение проводят, как указано в статье *Толбутамид,* на полученной хроматограмме должно обнаруживаться только одно основное пятно.

Толуолсульфоновая кислота. $C_7H_8O_3S{\cdot}H_20$. *(М.м.* 190,2). *1091600.* [6192-52-5].

4-Метилбензолсульфоновая кислота.

Содержит не менее 87,0% $C_7H_8O_3S$.

Кристаллический порошок или кристаллы белого цвета. Легко растворима в воде, растворима 96% спирте и эфире.

Трагакант. *1092300.* [9000-65-1].

Засохшая на воздухе камедь, вытекающая из надрезов ствола и ветвей Astragalus gummifer Labill и другие виды Astragalus западной Азии.

Состоит из белых или желтовато-белых просвечивающих, часто морщинистых роговидных кусков различной формы, ровных и гладких на изломе.

Хранят в защищенном от света месте.

Треонин. $C_4H_9NO_3$. *(М.м.* 119,1). *1090000.* [72-19-5].

(2*S*,3*R*)-2-амино-3-гидроксибутановая кислота.

Содержит не менее 99,0% и не более 101,0% $C_4H_9NO_3$ в пересчете на сухое вещество.

Белый кристаллический порошок или бесцветные кристаллы. Растворим в воде, практически нерастворим в спирте и эфире.

Хранят в защищенном от света месте.

Триамцинолон. $C_{21}H_{27}FO_6$. *(М.м.* 394,4). *1111300.* [124-94-7]. 9-Фтор-11b ,16a ,17,21-тетрагидроксипрегна-1,4-диен-3,20-дион.

Кристаллический порошок.

Температура плавления: от 262°С до 263°С.

Триацетин. $C_9H_{14}O_6$. *(М.м.* 218,2). *1092400* [102-76-1].

Пропан-1,2,3-триилтриацетат.

Почти прозрачная, бесцветная или желтоватого цвета жидкость. Растворим в воде, смешиваете с 96% спиртом и эфиром.

d_{20}^{20}: около1,16.

n_D^{20}: около 1,43.

Температура кипения: около 260°С.

Трикозан. $C_{23}H_{48}$. *(М.м.* 324,6). *1092800.* [638-67-5]

Кристаллы белого цвета. Практически нерастворим в воде, растворим в эфире и гексане.

n_D^{20}: около 1,447.

Температура плавления: около 48°С.

Трилон Б. См. *Натрия эдетат.*
Триметилпентан. C_8H_{18}. *(М.м.* 114,2). *1093400.* [540-84-1]. Изо-октан. 2,2,4-Триметилпентан.

Бессцветная, воспламеняющаяся жидкость. Практически нерастворим в воде, растворим в этаноле.

d_{20}^{20}: от 0,691 до 0,+696.

n_D^{20}: от 1,391 до 1,393.

Температурные пределы перегонки (2.2.11). От 98°С до 100°С; должно перегоняться не менее 95%

Триметилпентан, используемый в спектрофотометрии, должен выдерживать следующее дополнительное испытание.

Минимальное пропускание (2.2.25): 98%. Определение проводят в области длин волн от 250 нм до 420 нм, используя в качестве компенсационной жидкости *воду Р.*

Триметилпентан Р1. *1093401.*

Должен выдерживать требования для *триметилпентана Р со* следующим изменением.

Оптическая плотность (2.2.25). Не более 0,07. Определение проводят в области длин волн от 220 нм до 360 нм, используя в качестве компенсационной жидкости *воду Р.*

N-Триметисилилимидазол.$C_6H_{12}N_2Si$ *(М.м.* 140,3). *1100500.* [18156-74-6].

1-Триметилсилилимидазол.

Бесцветная, гигроскопичная жидкость.

d_{20}^{20}: около 0,96.

n_D^{20}: около 1,48.

Хранят в воздухонепроницаемом контейнере.

N,O-бис(Триметилсилил)ацетамид. $C_8H_{21}NOSi_2$. *(М.м.* 203,4). *1093600.* [10416-59-8].

Бесцветная жидкость.

d_{20}^{20}*:* около 0,83.

Трипсин. *1094500.* [9002-07-7].

Протеолитический фермент, полученный активацией трипсиногена, извлечённого из поджелудочной железы быка *(Bos taurus L.).*

Кристаллический или аморфный порошок белого цвета. Умеренно растворим в воде.

Трипсин для пептидного картирования. *1094600.* [9002-07-7].

Трипсин высокой чистоты, обработанный с целью повышения химотрипсиновой активности.

Триптофан. $C_{11}H_{12}N_2O_2$. *(М.м.* 204,2). *1094700.* [73-22-3].

Кристаллический порошок от белого до желтовато-белого цвета или бесцветные кристаллы. Мало растворим в воде, очень мало растворим в 96% спирте, практически нерастворим в эфире.

$[a]_D^{20}$: около —30°. Определение проводят, используя раствор 10 г/л.

1,3,5-Трис[3,5-ди(1,1-диметилэтил)-4-гидрокси-бензил]-1,3,5-триазин-2,4,6(1H,3H,5H)-трион. $C_{48}H_{69}O_6N_3$ *(М.м.* 784.1). *1094000.* [27676-62-6].

Кристаллический порошок белого цвета. Температура плавления: от 218°С до 222 °С.

Трис [2,4-ди(1,1 -диметилэтил)фенил] фосфит. $C_{42}H_{63}O_3P$. *(М.м.* 647). *1094100.* [31570-04-4].

Порошок белого цвета.

Температура плавления: от 182°*С* до 186°С

Трис(гидроксиметил)аминометан. $C_4H_{11}NO_3$. (*М.м.* 121,1). *1094200.* [77-86-1]. Аминометилидинетри(метанол). Трометамин.

Содержит не менее 99,0% и не более 100,5% $C_4H_{11}NO_3$ в пересчете на сухое вещество.

Белый кристаллический порошок или бесцветные кристаллы. Легко растворим в воде, умеренно растворим в спирте, очень мало растворим в этилацетате.

Температура плавления: от 168^{o}С до 174^{o}С.

Трис(гидроксиметил)аминометана раствор. *1094201.*

Раствор *трис(гидроксиметил)аминометана Р* содержит эквивалент 24,22 г $C_4H_{11}NO_3$ в 1000,0 мл.

Трисцианоэтоксипропан. $C_{12}H_7N_3O_3$. *(М.м.* 251,3). *1093900.*

1,2,3-Трис(2-цианоэтокси)пропан.

Вязкая жидкость коричнево-жёлтого цвета. Растворим в метаноле.

Используют в качестве неподвижной фазы в газовой хроматографии.

d_{20}^{20} : около 1,11.

Вязкость (2.2.9). Около 172 мПа·с.

Трифенилметанол.$C_{19}H_{16}O$. *(М.м.* 260.3). *1093700.* [76-84-6]. Трифенилкарбинол.

Бесцветные кристаллы. Практически нерастворим в воде, легко растворим в 96% спирте.

Трифенилтетразолия хлорид. $C_{19}H_{15}ClN_4$. *(М.м.* 334,8). *1093800.* [298-96-4].

2,3,5-Трифенил-2Н-тетразолия хлорид.

Содержит не менее 98,0% $C_{19}H_{15}ClN_4$.

Порошок бледно-жёлтого или тускло-жёлтого цвета. Растворим в воде, ацетоне и 96% спирте, практическине растворим в эфире.
Температура плавления: около 240°С с разложением.
Количественное определение. 1,000 г растворяют в смеси 5 мл *кислоты азотной разведенной Р* и 45 мл *воды Р,* прибавляют 50,0 мл *0,1 М раствора серебра нитрата* и нагревают до кипения. Охлаждают, прибавляют 3 мл *дибутилфталата Р,* энергично встряхивают и титруют *0,1 М раствором аммония тиоцианата,*

используя в качестве индикатора 2 мл *раствора железа (III) аммония сульфата Р2.*

1 мл 0,1 *М раствора серебра нитрата* соответствует 33,48 мг $C_{19}H_{15}ClN_4$.

Хранят в защищённом от света месте.

Трифенилтетразолия хлорида раствор. *1093801.*

Раствор 5 г/л в *96% спирте, свободном от альдегидов, Р.*

Хранят в защищённом от света месте.

Трифторуксусная кислота. $C_2HF_3O_2$. (*М.м.* 114,0). *1093200.* [76-05-1].

Содержит не менее 99% $C_2HF_3O_2$.

Жидкость, смешивается с ацетоном, 96% спиртом и эфиром.

d_{20}^{20}: около 1,53.

Температура кипения: около 72°C.

Используют квалификацию, пригодную для секвентации протеинов.

Хранят в воздухонепроницаемом контейнере.

Трифторуксусный ангидрид. $C_4F_6O_3$. *(М.м.* 210,0). *1093300.* [407-25-0].

Бесцветная жидкость.

d_{20}^{20}: около 1,5.

Трихлорметан. См. *Хлороформ.*

Трихлортрифторэтан. $C_2Cl_3F_3$. *(М.м.* 187,4). *1092700.* [76-13-1].

1,1,2-Трихлор-1,2,2-трифторэтан.

Бесцветная, летучая жидкость. Практически нерастворим в воде, смешивается с ацетоном и эфиром.

d_{20}^{20}: около 1,58.

Температурные пределы перегонки (2.2.11). От 47°C до 48°C; должно перегоняться не менее 98%.

Трихлоруксусная кислота. $C_2HCl_3O_2$. *(М.м.* 163,4). *1092500.* [76-03-9].

Бесцветные кристаллы или кристаллическая масса. Очень легко расплывается на воздухе, очень легко растворима в воде и 96% спирте.

Хранят в воздухонепроницаемом контейнере.

Трихлоруксусной кислоты раствор. *1092501.*

40,0 г *трихлоруксусной кислоты* растворяют в *воде Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 1000,0 мл. Концентрацию определяют титрованием *0,1 М раствором натрия гидроксида* и, если необходимо, доводят до концентрации (40±1) г/л.

1,1,1-Трихлорэтан. $C_2H_3Cl_3$. *(М.м.* 133,4). *1092600.* [71-55-6]. Метилхлороформ.

Невоспламеняющаяся жидкость. Практически нерастворим в воде, растворим в ацетоне, эфире и метаноле.

d_{20}^{20} : около 1,34.

n_D^{20} : около 1,438.

Температура кипения: около 74°С.

Трихлорэтилен. C_2HCl_3. *(М.м.* 131,4). *1102100.* [79-01-6].

Бесцветная жидкость. Практически нерастворим в воде, смешивается с 96% спиртом и эфиром.

d_{20}^{20} : около 1,46.

n_D^{20} : около 1,477.

Триэтаноламин. $C_6H_{15}NO_3$. *(М.м.* 149,2). *1092900.* [102-71-6].

2,2',2''-Нитрилотриэтанол.

Бесцветная, вязкая, очень гигроскопичная жидкость, под действием воздуха и света приобретает коричневую окраску. Смешивается с водой, ацетоном, 96% спиртом, глицерином (85%) и метанолом.

d_{20}^{20} : около 1,13.

Хранят в воздухонепроницаемом контейнере, в защищённом от света месте.

Триэтиламин. $C_6H_{15}N$. *(М.м.* 101,2). *1093000.* [121-44-8]. N,N-Диэтилэтанамин.

Бесцветная жидкость. Мало растворим в воде при температуре ниже 18,7°С, смешивается с 96% спиртом и эфиром.

d_{20}^{20} : около 0,727.

n_D^{20} : около 1,401.

Температура кипения: около 90°С.

Триэтилендиамин. $C_6H_{12}N_2$. *(М.м.* 112,2). *1093100.* 1,4-Диазабицикло[2.2.2]октан.

Кристаллы, очень гигроскопичны. Легко сублимируется при комнатной температуре. Легко растворяется в воде, ацетоне и этаноле.

Температура кипения: около 174°С.

Температура плавления: около 158°С.

Хранят в воздухонепроницаемом контейнере.

Тромбин бычий. *1090200.* [9002-04-4].

Ферментный препарат, полученный из бычьей плазмы, превращающий фибриноген в фибрин.

Порошок желтовато-белого цвета.

Хранят при температуре не выше О°С.

Тромбин человеческий. *1090100* [9002-04-4].

Сухой тромбин человеческий. Ферментный препарат, превращающий фибриноген человеческий в фибрин. Получают из человеческой жидкой плазмы путём осаждения подходящими солями и органическими растворителями в условиях контроля pH, ионной силы и температуры.

Порошок желтовато-белого цвета. Легко растворим в растворе 9 г/л натрия хлорида с образованием мутного бледно-жёлтого окрашивания.

Хранят в стеклянных контейнерах, укупоренных в атмосфере азота, при температуре не выше 25°С.

Тромбина человеческого раствор. *1090101.*

Тромбин человеческий Р восстанавливают, как указано производителем, и разводят *буферным раствором трис(гидроксиметил)аминометана-натрия хлорида рН 7.4 Р до* концентрации 5 МЕ/мл.

Тромбопластина реактив. *1090300.*

1,5 г *мозга бычьего, высушенного ацетоном Р,* экстрагируют 60 мл *воды Р* при температуре 50°С в течение 15 мин, центрифугируют при 1500 об/мин в течение 2 мин и декантируют надосадочную жидкость. Экстракт сохраняет активность в течение нескольких суток при хранении в холодильнике. Может содержать 3 г/л *крезола Р* в качестве антимикробного консерванта.

Трометамин. См. *Трис(гидроксимеитил)аминометан.*

Тропеолин 00. $C_{18}H_{14}KN_3O_3S$ (*М.м.* 391,47).

Калиевая соль 4-[(4-анилинофенил)азо]-бензолсульфокислота.

Оранжево-желтый порошок или золотисто-желтые игольчатые кристаллы. Растворим в горячей воде и в 96% спирте.

Тропеолина 00 раствор.

0,1 г *тропеолина 00 Р* растворяют в *воде Р* и доводят объем раствора этим же растворителем до 100 мл.

Растворение проводят при нагревании на водяной бане.

ТСХ пластинка со слоем силикагеля. *1116700.*

Подложка из стекла, металла или пластика, покрытая слоем силикагеля с подходящей толщиной и размером частиц (обычно от 2 мкм до 10 мкм для пластин с мелким размером частиц (Высокоэффективная тонкослойная хроматография (ВЭТСХ) и от 5 мкм до 40 мкм для обычных ТСХ пластин). Если необходимо, размер частиц указывают после названия сорбента в испытаниях, где он используется.

Сорбент может содержать связующее органическое вещество.

Хроматографическая разделяющая способность. На пластинку наносят необходимый объём *раствора для определения пригодности ТСХ пластинок Р* (10 мкл для обычной пластинки и от 1 мкл до 2 мкл для пластинки с мелким размером частиц). Хроматографируют в системе растворителей *метанол Р - толуол Р* (20:80). Когда фронт растворителей пройдет две трети длины пластинки, она считается пригодной, если на ней видны четыре чётко разделённых пятна:

пятно бромкрезолового зелёного с R_f не более 0,15,
пятно метилового оранжевого с R_f в пределах от 0,1 до 0,25,
пятно метилового красного с R_f *в* пределах от 0,35 до 0,55,
пятно Судана красного G с R_f в пределах от 0,75 до 0,98.

Раствор для определения пригодности ТСХ пластинок. *1116600.*

Смешивают по 1,0 мл раствора 0,5 г/л *судана красного GP в толуоле Р,* свежеприготовленного раствора 0,5 г/л *метилового оранжевого Р* в *этаноле Р,* раствора 0,5 г/л *бромкрезолового зелёного* в *ацетоне Р,* раствора 0,25 г/л *метилового красного Р* в *ацетоне Р* и доводят объём полученного раствора *ацетоном Р до* 10,0 мл.

ТСХ пластинка со слоем силикагеля F_{254}. *1116800.*

Должна выдерживать требования для *ТСХ пластинки со слоем силикагеля Р* со следующими изменениями.

Содержит флуоресцентный индикатор с максимумом поглощения при длине волны 254 нм.

Гашение флуоресценции. На пластинку наносят в пять точек последовательно возрастающие объёмы от 1 мкл до 10 мкл для обычной ТСХ пластинки и от 0.2 мкл до 2 мкл для ВЭТСХ пластинки раствора 1 г/л *кислоты бензойной Р* в смеси растворителей *этанол Р- циклогексан Р*(15:85). Хроматографируют в той же смеси растворителей. Когда фронт растворителя пройдет половину длины пластинки, её вынимают из камеры и сушат до испарения растворителей. Пластинку просматривают в УФ-свете при длинне волны 254 нм. На обычных ТСХ пластинках кислота бензойная должна обнаруживаться в виде тёмных пятен на флуоресцирующем фоне примерно на середине хроматограммы на нанесённых количеств 2 мкг и более. На ВЭТСХ пластинках кислота бензойная должна обнаруживаться в виде тёмных пятен на флуоресцирующем фоне примерно на середине хроматограммы для нанесённых количеств 0,2 мкг и более.

ТСХ пластинка со слоем силикагеля G. *1116900.*

Должна выдерживать требования для *ТСХ пластинки со слоем силикагеля Р* со следующим изменением.

Содержит кальция сульфат полугидрат (гипс) в качестве связующего вещества.

ТСХ пластинка со слоем силикагеля *GF_{254}. 1117000.*

Должна выдерживать требования для *ТСХ пластинки со слоем силикагеля Р* со следующими изменениями.

Содержит кальция сульфат полугидрат (гипс) в качестве связующего вещества.

Гашение флуоресценции. Должна выдерживать требования для *ТСХ пластинки со слоем силикагеля F_{254} Р.*

ТСХ пластинка со слоем силикагеля силанизированного. *1117100.*

Подложка из стекла, металла или пластика, покрытая слоем силикагеля силанизированного с подходящей толщиной и размером частиц (обычно от 2 мкм до 10 мкм для пластин с мелким размером частиц, Высокоэффективная тонкослойная хроматография (ВЭТСХ) и от 5 мкм до 40 мкм для обычных ТСХ пластин). Если необходимо, размер частиц указывают после названия сорбента в испытаниях, где он используется.

Сорбент может содержать связующее органическое вещество.
Хроматографическая разделяющая способность. По 0,1 г *метиллаурата Р, метилмеристата Р, метилпальмитата Р и метилстеарата* Р помещают в коническую колбу вместимостью 250 мл, прибавляют 40 *мл раствора калия гидроксида спиртового Р* и нагревают с обратным холодильником на водяной бане в течение 1 ч. Охлаждают, раствор помещают в делительную воронку с помощью 100 мл *воды Р,* подкисляют *кислотой хлористоводородной разведенной Р* до pH от 2 до 3 и встряхивают с тремя порциями, по 10 мл каждая, *метиленхлорида Р.* Объединённые метиленхлоридные извлечения сушат над *натрия сульфатом безводным Р,* фильтруют и выпаривают на водяной бане досуха. Сухой остаток растворяют в 50 мл лет *метиленхлорида Р* (испытуемый раствор). Определение проводят методом ТСХ *(2.2.27),* используя *ТСХ пластинку со слоем силикагеля силанизированного Р.* На пластинку наносят в три точки необходимый объём испытуемого раствора (около 10 мкл для обычной ТСХ пластинки и от 1 мкл до 2 мкл для ВЭТСХ пластинки с мелким размером частиц). Хроматографируют в системе растворителей *кислота уксусная ледяная Р — вода Р — диоксан Р* (10:25:65). Когда фронт растворителей пройдет две трети длины пластинки, её вынимают из камеры и сушат при температуре 120°С в течение 30 мин. Пластинку охлаждают, опрыскивают раствором 35 г/л *кислоты фосфорномолибденовой Р в 2-пропаноле Р* и нагревают при температуре 150°С до появления пятен. Затем пластинку обрабатывают парами аммиака до получения фона белого цвета. Пластинка считается пригодной, если на ней видны четыре чётко разделённых пятна.

ТСХ пластинка со слоем силикагеля силанизированного F_{254}. *1117200.*

Должна выдерживать требования для *ТСХ пластинки со слоем силикагеля силанизированного Р* со следующим изменением.

Содержит флуоресцентный индикатор с максимумом поглощения при длине волны 254 нм.

Туйон. $C_{10}H_{16}O$. *(М.м.* 152,2). *1116500.* [546-80-5].

4-Метил-1 -(1-метилэтил)бицикло[3.1.0]гексан-3-он.

Бесцветная или почти бесцветная жидкость. Практически не растворим в воде, растворим в 96% спирте и многих других органических растворителях.

d_{20}^{20}*:* около 0,925.

n_D^{20} : около 1,455.

$[\alpha]_D^{20}$:около -15°.

Температура кипения: около 86°С.

Туши черной раствор. Жидкую черную тушь разводят *водой Р* в соотношении 1:10.

Углеводороды с низким давлением паров (тип L). *1049400.*

Маслянистая масса. Растворимы в бензоле и толуоле.

Углерод графитированный для хроматографии. *1015900.*

Углеродные цепочки с длиной цепи более C_9; размер частиц от 400 мкм до 850 мкм.

Плотность: 0,72.

Удельная площадь поверхности: 10 м^2/г.

Не применяют при температуре выше 400°С.

Углерода диоксид. CO_2. *(М.м.* 44,01). *1015600.* [124-38-9].

Содержит минимум 99,5% (*об/об*) CO_2 в газообразном состоянии.

Бесцветный газ. 1 объем газа растворяется примерно в 1 объеме воды при температуре 20^{o}С и давлении 101 кПа.

Углерода диоксид Р1. CO_2. *(М.м.* 44,01). *1015700.*

Содержит не менее 99,995*% (об/об)* CO_2.

Углерода монооксид: менее 5 ppm.

Кислород: менее 25 ppm.

Углерода дисульфид. CS_2 *(М.м.* 76,1). *1015800.* [75-15-0]. Сероуглерод.

Бесцветная или желтоватого цвета воспламеняющаяся жидкость. Практически нерастворим в воде, смешивается с этанолом и эфиром.

d_{20}^{20}: около 1,26.

Температура кипения: от 46°С до 47°С.

Углерода монооксид. СО. *(М.м.* 28,01). *1016000.* [630-08-0].

Содержит не менее 99,97% *(об/об)* СО.

Углерода тетрахлорид. CCl_4. (*М.м.* 153,8). *1016100.* [56-23-5]. Тетрахлорметан. Углерод четырёххлористый.

Прозрачная, бесцветная жидкость. Практически нерастворим в воде, смешивается с 96% спиртом.

d_{20}^{20}: от 1,595 до 1,598.

Температура кипения: от 76°C до 77°C.

Уголь активированный. *1017800.* [64365-11-3].

Черный легкий порошок без твердых частиц. Практически нерастворим во всех обычных растворителях.

Потеря в массе при высушивании (2.2.32). Не более 15%. Определение проводят из 1,00 г высушивание при температуре 120°C в течение 4 ч.

Адсорбционная способность. В 100 мл коническую колбу помещают 0,300 г активированного угля, прибавляют 25 мл свежеприготовленного раствора 10 г/л *феназона Р*. Тщательно встряхивают в течение 15 мин. Фильтруют и отбрасывают первые 5 мл фильтрата. К 10 мл фильтрата прибавляют 1,0 г *калия бромида Р* и 20 мл *кислоты хлористоводородной разведенной Р* и в качестве индикатора - 0,1 мл *раствора метилового красного Р*. Титруют *0,0167 М раствором калия бромата* до исчезновения красного окрашивания, медленно прибавляя титрант в конце титрования (1 капля каждые 15 с). Параллельно проводят контрольное титрование, используя 10,0 мл раствора феназона. Расчитывают количество абсорбированного феназона на 100 г активированного угля по формуле:

$$\frac{2,353 \cdot (a-b)}{m},$$

где:

a – объем 0,0167 М калия бромата, пошедшего на титрование контрольного раствора, в миллилитрах;

b - объем 0,0167 М калия бромата, пошедшего на титрование испытуемого раствора, в миллилитрах;

m – масса испытуемой субстанции, в граммах.

100 г активированного угля должны адсорбировать не менее 40 г феназона, в пересчете на сухое вещество.

Хранят в плотно укупоренном контейнере.

Уксусный ангидрид. $C_4H_6O_3$. (*М.м.* 102,1). *1000500.* [108-24-7].

Содержит не менее 97,0*% (м/м)* $C_4H_6O_3$.

Прозрачная бесцветная жидкость. # При растворении в воде образуется кислота уксусная, причем реакция сначала идет медленно, а затем ускоряется и проходит бурно (возможны выбросы). Обращаться с осторожностью.

Температура кипения: от 136°C до 142°C.

Количественное определение. 2,00 г помещают в стеклянную колбу с притёртой пробкой, растворяют в 50,0 мл *1 М раствора натрия гидроксида,* кипятят с обратным холодильником в течение 1 ч и титруют *1 М раствором кислоты хлористоводородной,* используя в качестве индикатора 0,5 мл *раствора*

фенолфталеина Р. Вычисляют количество миллилитров *l М раствора натрия гидроксида,* израсходованное на титрование 1 г *(n_1).*

2,00 г помещают в стеклянную колбу с притёртой пробкой, растворяют в 20 мл *циклогексана Р,* охлаждают на льду, затем прибавляют охлаждённую смесь 10 мл *анилина Р и* 20 мл *циклогексана Р,* кипятят с обратным холодильником в течение 1 ч, прибавляют 50,0 мл *1 М раствора натрия гидроксида,* перемешивают и титруют *1 М раствором кислоты хлористоводородной,* используя в качестве индикатора 0,5 мл *раствора фенолфталеина Р.* Вычисляют количество миллилитров *1 М раствора натрия гидроксида,* израсходованное на титрование 1 г *(n_2).*

Содержание $C_4H_6O_3$, в процентах, вычисляют по формуле:

$$10{,}2(n_1 - n_2)$$

Уксусного ангидрида раствор Р1. *1000501.*

25,0 мл *уксусного ангидрида Р* растворяют в *безводном пиридине Р* доводят тем же растворителем до объёма 100,0 мл.

Хранят, защищая от света и воздуха.

Уксусного ангидрида - кислоты серной раствор. *1000502.*

Осторожно смешивают 5 мл *уксусного ангидрида Р* и 5 мл *кислоты серной Р.* Полученную смесь прибавляют при охлаждении по каплям к 50 мл *этанола Р.*

Готовят непосредственно перед использованием.

Уксусная кислота безводная. $C_2H_4O_2$. *(М.м.* 60,1). *1000300.* [64-19-7].

Содержит не менее 99,6*% (м/м)* $C_2H_4O_2$.

Бесцветная жидкость или белые блестящие папоротникообразные кристаллы. Легко смешивается или легко растворяется в воде, 96% спирте, эфире, глицерине (85%) и большинстве жирных и эфирных маслах.

d_{20}^{20}: от 1,052 до 1,053.

Температура кипения: от 117°С до 119°С.

Раствор 100 г/л является сильной кислотой (2.2.4).

Раствор 5 г/л кислоты уксусной, нейтрализованный *раствором аммиака разведенным Р2,* даёт реакцию (b) на ацетаты *(2.3.1).*
Температура затвердевания (2.2.18). Не ниже 15,8°С.
Вода (2.5.12). Не более 0,4%. Если содержание воды превышает 0,4%, прибавляют рассчитанное количество *уксусного ангидрида Р.*

Хранят в защищённом от света месте.

Уксусная кислота ледяная. $C_2H_4O_2$. *(М.м.* 60,1). *1000400.* [64-19-7].

Содержит не менее 98,0*% (м/м)* $C_2H_4O_2$.

d_{20}^{20}: от 1,052 до 1,053.

Температура кипения: от 117°С до 119°С.

Раствор 100 г/л является сильной кислотой. Раствор 5 г/л кислоты уксусной, нейтрализованный *раствором аммиака разведенным Р2,* даёт реакцию (b) на ацетаты *(2.3.1).*

Количественное определение. 5,00 г кислоты уксусной ледяной разводят *водой Р до* объёма 100,0 мл. 25,0 мл полученного раствора титруют *1 М раствором натрия гидроксида,* используя в качестве индикатора 0,5 *мл раствора фенолфталеина Р.*

1 мл *1 М раствора натрия гидроксида* соответствует 60,1 мг $C_2H_4O_2$.

Уксусная кислота. *1000401.*

Содержит не менее 290 г/л и не более 310 г/л $C_2H_4O_2$ (*М.м.* 60,1).

30 г *кислоты уксусной ледяной Р* доводят *водой Р* до объёма 100 мл.

Уксусная кислота разведенная. *1000402.*

Содержит не менее 115 г/л и не более 125 г/л $C_2H_4O_2$. (*М.м.* 60,1).

12 г *кислоты уксусной ледяной Р* доводят *водой Р* до объёма 100 мл.

Уридин. $C_9H_{12}N_2O_6$. (*М.м.* 244,2). *1095100.* [58-96-8]. 1-*b* -D-Рибофуранозилурацил.

Кристаллический порошок белого или почти белого цвета. Растворим в воде.

Температура плавления: около 165°С.

Фактора V свертывания крови раствор. *1021400.*

Раствор фактора V свертывания крови может быть приготовлен следующим способом (или любым другим способом, исключающим фактор VIII).

Готовят реактив фактора V из свежеоксалатированной плазмы бычьей фракционированием при температуре 4°С с насыщенным раствором *аммония сульфата Р,* приготовленным при 4°С. Отделяют фракцию, которая осаждается в интервале насыщения от 38% до 50% и содержит фактор V, без существенного загрязнения фактором VIII. Аммония сульфат удаляют диализом и разводят раствором 9 г/л *натрия хлорида Р* до получения раствора, содержащего от 10% до 20% количества фактора V, присутствующего в обычной свежей плазме крови человека.

Определение содержания фактора V. Готовят два разведения препарата фактора V в *имидазольном буферном растворе pH 7,3 Р,* содержащих один объем препарата соответственно в 10 и 20 объемах буферного раствора. Каждый раствор испытывают следующим образом: смешивают 0,1 мл *субстрата плазмы без фактора V Р,* 0,1 мл испытуемого раствора, 0,1 мл *реактива тромбопластина Р* и 0,1 мл раствора 3,5 г/л *кальция хлорида Р* и измеряют время свертывания крови, т.е. интервал между моментом прибавления раствора кальция хлорида и первым признаком образования фибрина, который можно наблюдать визуально или при помощи соответствующих приборов.

Таким же образом определяют время свертывания крови (два параллельных определения) четырех растворов обычной плазмы крови человека в *имидазольном буферном растворе pH 7,3 Р,* содержащих соответственно 1 объём в десяти (эквивалент 100% фактора V), 1 объём в 50 (20%), 1 объём в 100 (10%) и 1 объём в 1000 (1%). Используя двустороннюю логарифмическую бумагу, наносят среднее значение времени свертывания крови для каждого раствора плазмы человека от эквивалента процентного содержания фактора V, в процентах, и с помощью интерполяции определяют содержание фактора V, в процентах, для двух разбавленных растворов фактора V. Среднее значение двух результатов дает содержание фактора V, в процентах, в испытуемом растворе,

Хранят раствор в замороженном состоянии при температуре не выше -20°С.

Фактор коагуляции Ха бычий. *1037300.* [9002-05-5].

Фермент, превращающий протромбин в тромбин. Полуочищенный препарат получают из жидкой бычьей плазмы; его можно получить также посредством активации зимогена фактора Х с помощью подходящего активатора, такого как яд гадюки Руссела.

Хранят лиофиллизированный препарат при температуре -20°С, замороженный раствор хранят при температуре ниже -20°С.

Фактор Xa бычьего раствор. *1037301.*

Восстанавливают в соответствии с указаниями производителя и разводят *буферным раствором трис(гидроксиметил)аминометана натрия хлорида pH 7,4 Р.*

Изменение оптической плотности не должно превышать 0,15-0,20 в мин. Измерение проводят при длине волны 405 нм *(2.2.25),* используя в качестве компенсационной жидкости *буферный раствор трис(гидроксиметил)-аминометана - натрия хлорида pH 7,4 Р.*

 # Фелинга реактив.

Раствор I. 34,6 г перекристаллизованного *меди сульфата Р* растворяют в *воде Р*, подкисленной 2-3 каплями раствора 160 г/л *кислоты серной Р*, и доводят объем раствора *водой Р* до 500 мл.

Раствор II. 173 г *калия-натрия тартрата Р* и 50 г *натрия гидроксида Р* растворяют в 400 мл *воды Р* и после охлаждения доводят объем раствора *водой Р* до 500 мл.

Реактивом служит смесь равных объемов обоих растворов. Готовят перед употреблением.

5 мл реактива Фелинга разбавляют 5 мл *воды Р* и нагревают до кипения. Раствор должен оставаться прозрачным и не выделять даже следов осадка.

Феназон. $C_{11}H_{12}N_2O$. *(М.м.* 188,2). *1063400.* [60-80-0].

1,5-диметил-2-фенил-1,2-дигидро-3*H*-пиразол-3-он.

Содержит не менее 99,0% и не более 100,5% $C_{11}H_{12}N_2O$ в пересчете на сухое вещество.

Белый или почти белый кристаллический порошок или бесцветные кристаллы. Очень легко растворим в воде, 96% спирте и метиленхлориде, умеренно растворим в эфире.

Температура плавления: от 109°С до 113°С.

Потеря в массе при высушивании (2.2.32). Не более 1%. Определяют из навески 1,000 г при высушивании под вакуумом при температуре 60°С в течение 6 ч.

Хранят в защищенном от света месте.

Фенантрен. $C_{14}H_{10}$. *(М.м.* 178,2). *1063200.* [85-01-8].

Кристаллы белого цвета. Практически нерастворим в воде, легко растворим в эфире, умеренно растворим в 96% спирте.

Температура плавления: около 100°С.

Фенантролина гидрохлорид. $C_{12}H_9ClN_2 \cdot H_2O$. *(М.м.* 234,7). *1063300.* [3829-86-5]. 1,10-Фенантролина гидрохлорид моногидрат.

Порошок белого или почти белого цвета. Легко растворим в воде, растворим в 96% спирте.

Температура плавления: около 215°С с разложением.

Фенилаланин. $C_9H_{11}NO_2$. *(М.м.* 165,2). *1064100.* [63-91-2]. (*S*)-2-амино-3-фенилпропановая кислота.

Кристаллический порошок белого или почти белого цвета или блестящие белые пластинки. Умеренно растворим в воде, очень мало растворим в 96% спирте,

практически нерастворим в эфире. Растворяется в разведенных минеральных кислотах и разведенных гидроксидов щелочных металлов.

Содержит не менее 98,5% и не более 101,0% $C_9H_{11}NO_2$ в пересчете на сухое вещество.

$[\alpha]_D^{20}$: от –33,0° до –35,5° .

Фенилгидразина гидрохлорид. $C_6H_9ClN_2$. *(М.м.* 144,6). *1064500.* [59-88-1].

Кристаллический порошок белого или почти белого цвета, под действием воздуха приобретает коричневую окраску. Растворим в воде и 96% спирте.

Температура плавления: около 245°C с разложением.

Хранят в защищённом от света месте.

Фенилгидразина гидрохлорида раствор. *1064501.*

0,9 г *Фенилгидразина гидрохлорида Р* растворяют в 50 мл *воды Р,* обесцвечивают *углем активированным Р* и фильтруют. К фильтрату прибавляют 30 мл *кислоты хлористоводородной Р* и доводят объём раствора *водой Р* до 250 мл.

Фенилгидразина раствор в кислоте серной. *1064502.*

65 мг *Фенилгидразина гидрохлорида Р,* предварительно перекристаллизованного из спирта *(85%, об/об) Р,* растворяют в смеси растворителей *вода Р - кислота серная Р* (80:170) и доводят той же смесью растворителей до объёма 100 мл.

Готовят непосредственно перед использованием.

α-Фенилглицин. $C_8H_9NO_2$. *(М.м.* 151,2). *1064300.* [2835-06-5].

(RS)-2-Амино-2-фенилуксусная кислота.

n-Фенилендиамина дигидрохлорид. $C_6H_{10}Cl_2N_2$. *(М.м.* 181,1). *1064200.* [615-28-1]. 1,4-Диаминобензола дигидрохлорид.

Кристаллический порошок или кристаллы белого цвета или слегка окрашенные. На воздухе краснеет. Легко растворим в воде, мало растворим в 96% спирте и эфире.

Фенилизотиоцианат. C_7H_5NS. *(М.м.* 135,2). *1121500.* [103-72-0].

Жидкость. Нерастворим в воде, растворим в 96% спирте.

d_{20}^{20}: около 1,13.

n_D^{20}: около 1,65.

Температура кипения: около 221°C.

Температура плавления: около -21°C.

Феноксибензамина гидрохлорид. $C_{18}H_{23}Cl_2NO$. *(М.м.* 340,3). *1063900.*

N-(2-Хлорэтил)-N-(1-метил-2-феноксиэтил)бензиламина гидрохлорид.

Содержит от 97,0% до 103,0% $C_{18}H_{23}Cl_2NO$, в пересчёте на сухое вещество.

Кристаллический порошок белого или почти белого цвета. Умеренно растворим в воде, легко растворим в 96% спирте.

Температура плавления: около 138°C.

Потеря в массе при высушивании (2.2.32). Не более *0,5%.* Сушат над *фосфора (V) оксидом Р* при давлении, не превышающем 670 Па, в течение 24 ч.

Количественное определение. 0,500 г растворяют в 50,0 мл *хлороформа, свободного от этанола, Р* и экстрагируют тремя порциями, по 20 мл каждая, *0,01 М раствора кислоты хлористоводородной.* Кислотный слой отбрасывают, а хлороформный слой фильтруют через вату. 5,0 мл полученного фильтрата доводят

хлороформом, свободным от этанола, Р до объёма 500,0 мл. Измеряют оптическую плотность полученного раствора в закрытой кювете в максимуме при длине волны 272 нм.
Вычисляют содержание $C_{18}H_{23}Cl_2NO$, принимая удельный показатель поглощения равным 56,3.

Хранят в защищённом от света месте.

Феноксиуксусная кислота. $C_8H_8O_3$. *(М.м.* 152,1). *1063800.* [122-59-8].

2-Феноксиэтановаякислота.

Кристаллы почти белого цвета. Умеренно растворима в воде, легко растворима в 96% спирте, эфире и кислоте уксусной ледяной.

Температура плавления: около 98°С.

Хроматография. Определение проводят, как указано в статье *Феноксиметилпенициллин;* на полученной хроматограмме должно обнаруживаться только одно основное пятно.

Феноксиэтанол. $C_8H_{10}O_2$. (*М.м.* 138,2). *1064000.* [122-99-6]. 2-Феноксиэтанол.

Прозрачная, бесцветная маслянистая жидкость. Мало растворим в воде, легко растворим в 96% спирте и эфире.

d_{20}^{20}:около 1,11.

n_D^{20}: около 1,537.

Температура затвердевания (2.2.18). Не ниже 12°С.

Фенол. C_6H_6O. (*М.м.* 94,1). *1063500.* [108-95-2].

Бесцветные или слабо-розовые, или бледно-желтоватые кристаллы или кристаллическая масса. Расплывается на воздухе. Растворим в воде, очень легко растворим в 96% спирте, глицерине, метиленхлориде.

Содержит не менее 99,0% и не более 100,5% C_6H_6O.

Температура затвердевания (2.2.18). Не менее 39,5°С.

Хранят в воздухонепроницаемом контейнере, в защищенном от света месте.

Фенол жидкий. Кислота карболовая жидкая. К 100 ч фенола Р, расплавленного на водяной бане, прибавляют 10 ч воды Р и хорошо перемешивают.

Содержит не менее 89,0% фенола.

d_{20}^{20}: от 1,058 до 1,065.

Хранят в плотно укупоренных контейнерах, в защищенном от света месте. Обращаются с предосторожностью.

Феноловый красный. *1063600.* [143-74-8]. См. *Фенолсульфонфталеин.*

Фенолового красного раствор. *1063601.*

0,1 г *фенолового красного Р* растворяют в смеси 2,82 мл *0,1 М раствора натрия гидроксида* и 20 мл *96% спирта Р,* доводят объём раствора *водой Р* до 100 мл.

Испытание на чувствительность. К 100 мл *воды, свободной от углерода диоксида, Р* прибавляют 0,1 мл раствора фенолового красного; появляется жёлтое

окрашивание, которое должно перейти в красно-фиолетовое при прибавлении не более 0,1 *мл 0,02 М раствора натрия гидроксида.*

Изменение окраски. От жёлтой до красновато-фиолетовой в интервале pH 6,8-8,4.

Фенолового красного раствор Р2.*1063603.*

Раствор I. 33 мг *фенолового красного Р* растворяют в 1,5 *мл раствора натрия гидроксида разведенного Р* и доводят объём раствора *водой Р* до 100 мл.
Раствор II. 25 мг *аммония сульфата Р* растворяют в 235 мл *воды Р,* прибавляют 105 мл раствора *натрия гидроксида разведенного Р* и 135 мл *кислоты уксусной разведенной Р.*

Раствор II смешивают с 25 мл раствора I. Если необходимо, доводят pH раствора до 4,7.

Фенолового красного раствор Р3. *1063604.*

Раствор I. 33 мг *фенолового красного Р* растворяют в 1,5 *мл раствора натрия гидроксида разведенного Р* и доводят объём раствора *водой Р* до 50 мл.

Раствор II. 50 мг *аммония сульфата* Р растворяют в 235 мл *воды Р;* прибавляют 105 *мл раствора натрия гидроксида разведенного Р* и 135 мл *кислоты уксусной разведенной Р.*

Раствор II смешивают с 25 мл раствора I. Если необходимо, доводят pH раствора до 4,7.

Фенолсульфонфталеин. $C_{19}H_{14}O_5S$. (*М.м.* 354,4). 3,3-бис(4-гидроксифенил)-3*Н*-2,1-бензоксатиол 1,1-диокид. Феноловый красный.

Содержит не менее 98,0% и не более 102,0% $C_{19}H_{14}O_5S$ в пересчете на сухое вещество.

От светло-красного до темно-красного цвета кристаллический порошок. Очень мало растворим в воде, мало растворим в 96% спирте.

Потеря в массе при высушивании (2.2.32). Не более 1%. Определяют из навески 1,00 г порошкообразной субстанции высушиванием при температуре от 100°С до 105°С.

Фенолфталеин. $C_{20}H_{14}O_4$. *(М.м.* 318,3). *1063700.* [77-09-8].

3,3-Бис(4-гидроксифенил)-3Н-изо-бензофуран-1-он.

Порошок от белого до желтовато-белого цвета. Практически нерастворим в воде, растворим в 96% спирте.

Фенолфталеина раствор. *1063702.*

0,1 г *фенолфталеина Р* растворяют в 80 мл *96% спирта Р* и доводят объём раствора *водой Р* до 100 мл.

Испытание на чувствительность. К 100 мл *воды, свободной от углерода диоксида, Р* прибавляют 0,1 мл раствора фенолфталеина; при прибавлении не более 0,2 мл *0,02 М раствора натрия гидроксида* окраска раствора должна измениться от бесцветной до розовой.

Изменение окраски. От бесцветной до ярко-розовой в интервале pH 8,2-10,0.

Фенолфталеина раствор Р1.*1063703.* Раствор 10 г/л в *96% спирте Р.*

Фенхон. $C_{10}H_{16}O$. *(М.м.* 152,2). *1037600.* [7787-20-4].

1,3,3-Триметилбицикло[2.2.1]гептан-2-он.

Маслянистая жидкость. Смешивается с 96% спиртом и эфиром, практически нерастворим в воде.

n_D^{20}: около 1,46.

Температура кипения$_{15мм}$: около 66°С.

Фенхон, используемый в газовой хроматографии, должен выдерживать следующее испытание.

Количественное определение. Проводят методом газовой хроматографии *(2.2.28)* в условиях, указанных в статье *Фенхель горький,* используя фенхон в качестве испытуемого раствора.

Площадь основного пика не должна быть менее 98,0% общей площади всех пиков.

Ферроин. *1038100.* [14634-91-4].

0,7 г *железа (II) сульфата Р* и 1,76 г *фенантролина гидрохлорида Р* растворяют в 70 мл *воды Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 100 мл.

Испытание на чувствительность. К 50 мл *кислоты серной разведенной Р* прибавляют 0,15 мл раствора *осмия (VIII) оксида Р* и 0,1 мл ферроина. После прибавления 0,1 мл *0,1 М раствора аммония церия нитрата* окраска раствора должна измениться от красной до голубой.

Ферроцифен. $C_{26}H_{16}FeN_6$. *(М.м.* 468,3). *1038000.* [14768-11-7].

Дицианобис(1,10-фенантролин)железа(II).

Кристаллический порошок фиолетово-бронзового цвета. Практически нерастворим в воде и 96% спирте.

Хранят в сухом защищённом от света месте.

Фибрин синий. *1101400.*

1,5 г фибрина смешивают с 30 мл раствора 5 г/л *индигокармина Р* в 1% *(об/об)* растворе *кислоты хлористоводородной разведенной Р*, смесь нагревают до температуры 80°С и выдерживают при этой температуре около 30 мин при перемешивании, охлаждают и фильтруют. Осадок тщательно промывают, ресуспендируя в 1*% (об/об)* раствор *кислоты хлористоводородной разведенной Р и* перемешивая около 30 мин, и фильтруют. Осадок промывают три раза, сушат при температуре 50°С и измельчают.

Фибрин конго красный. *1038400.*

Промытый фибрин нарезают на маленькие кусочки и оставляют на ночь в растворе 20 г/л *конго красного Р* в *спирте (90%, об/об) Р* и фильтруют; фибрин промывают *водой Р* и хранят под *эфиром Р.*

Фибриноген. *1038500.* [9001-32-5].

Фибриноген получают из плазмы крови донора. Переход фибриногена в фибрин, происходящий под влиянием тромбина, обеспечивает конечную стадию процесса свертывания крови – образование сгустка.

При растворении в указанном на этикетке объеме растворителя, раствор содержит не менее 10 г/л фибриногена.

Белый или желтоватй порошок или сухая пористая масса.

Хранят в защищенном от света месте.

Фиксирующий раствор. *1122600.*

К 250 мл *метанола Р* прибавляют 0,27 мл *формальдегида Р* и доводят объем раствора *водой Р* до 500,0 мл.

Фишера реактив. См. *Йодсернистый реактив.*

Флороглюцин. $C_6H_60_3{\cdot}2H_2O$. *(М.м.* 162,1). *1064600.* [6099-90-7].

Бензол- 1,3,5-триол.

Кристаллы белого или желтоватого цвета. Мало растворим в воде, растворим в 96% спирте.
Температура плавления: около 223°С (метод мгновенного плавления).

Флороглюцина раствор. *1064601.*

К 1 мл раствора 100 г/л *флороглюцина Р в 96% спирте Р* прибавляют 9 мл *кислоты хлористоводородной Р.*

Хранят в защищённом от света месте.

 # Флороглюцина раствор в эфире.

0,1 г *флороглюцина Р* растворяют в *эфире Р* и разбавляют *эфиром Р* до 100 мл. Раствор применяют свежеприготовленным.

 # Флороглюцина раствор в кислоте серной.

1,5 г *флороглюцина Р* растворяют при нагревании на водяной бане в смеси из 75 г *воды Р* и 50 г *кислоты серной Р*.

Флуорантен. $C_{16}H_{10}$. *(М.м.* 202,3). *1038600.* [206-44-0].

1,2-(1,8-Нафтилен)бензол. 1,2-Бензаценафтен.

Кристаллы от жёлтого до желтовато-коричневого цвета.

Температура кипения: около 384°С.

Температура плавления: от 105°С до 110°С.

Флуоресцеин. $C_{20}H_{12}O_5$ *(М.м.* 332,3). *1106300.* [2321-07-5].

3',6'-Дигидроксиспиро[изобензофуран-1 (3Н),9'-[9Н]ксантен]-3-он.

Порошок оранжево-красного цвета. Практически нерастворим в воде, растворим в теплом 96% спирте, практически нерастворим в эфире, растворим в растворах гидроксидов щелочных металлов. В растворе флуоресцеин обнаруживает зелёную флуоресценцию.

Температура плавления: около 315°С.

Флуоресцеин-сопряженная сыворотка против бешенства. *1038700.*

Иммуноглобулиновая фракция с высоким уровнем антител против бешенства, приготовленная из сыворотки подходящих животных, иммунизированных инактивированным вирусом бешенства; иммуноглобулин сопряжен с флуоресцеин-изотиоцианатом.

Флуфенаминовая кислота. $C_{14}H_{10}F_3NO_2$. *(М.м.* 281,2). *1106200.* [530-78-9].

2-[[3-(Трифторметил)фенил] -амино]бензойная кислота.

Кристаллический порошок или игольчатые кристаллы бледно-жёлтого цвета. Практически нерастворима в воде, легко растворима в 96% спирте.

Температура плавления: от 132°С до 135°С.

Фолиевая кислота. $C_{19}H_{19}N_7O_6$. *(М.м.* 441,4). *1039000.* [75708-92-8]. (2S)-2-[[4-[[(2-амино-4-оксо-1,4-дигидроптеридин-6-ил)метил]амино]бензоил]амино]пентадионовая кислота.

Содержит не менее 96,0% и не более 102,0% $C_{19}H_{19}N_7O_6$ в пересчете на безводное вещество.

Желтоватый или оранжевый кристаллический порошок. Практически нерастворим в воде и в большинстве органических растворителях. Растворяется в разведенных кислотах и растворах щелочей.

Вода (2.5.12). От 5,0% до 8,5%. Определяют из 0,150 г полумикрометодом.

Хранят в защищенном от света месте.

Фолина реактив.
В круглодонную колбу помещают 70 мл *воды Р*, 10 г *натрия вольфрамата Р*, 2,5 г *кислоты фосфорномолибденовой Р*, 5 мл раствора 250 г/л *кислоты фосфорной Р*, кипятят с обратным холодильником 2 ч, затем охлаждают, разбавляют *водой Р* до 100 мл. Хорошо перемешивают. Хранят в защищенном от света месте в стеклянном контейнере с притертой пробкой.

Формалин. См. *Формальдегида раствор.*

Формальдегид. *1039100.* [50-00-0]. См. *Раствор формальдегида.*

Формальдегида раствор. CH_2O. *(М.м.* 30,03). *1039101.* # Формалин.
Содержит не менее 34,5% (*м/м*) и не более 38,5% (*м/м*). Содержит от 9,0% (*об/об*) до 15,0% (*об/об*) метанола в качестве стабилизатора или # не более 1,0% (*м/об*) метанола в качестве стабилизатора.
Прозрачная бесцветная жидкость. Смешивается с водой и 96% спиртом. Может мутнеть при хранении.
Хранят в защищенном от света месте при температуре от 15°С до 25°С.

Формальдегида раствор в серной кислоте. *1086805.*

2 мл раствора формальдегида Р смешивают со 100 мл *кислоты серной Р.*

Формамид. CH_3NO. *(М.м.* 45,0). *1039200.* [75-12-7].

Прозрачная, бесцветная, маслянистая, гигроскопичная жидкость. Смешивается с водой и 96% спиртом. Гидролизуется водой.

Температура кипения: около 103°С. Определение проводят под давлением 2 кПа.

Хранят в воздухонепроницаемом контейнере.

Формамид обработанный. *1039201.*

1,0 г *кислоты сульфаминовой Р* диспергируют в 20,0 мл *формамида Р,* содержащего 5% *(об/об) воды Р.*

Формамид Р1. *1039202.*

Должен выдерживать требования для *формамида Р и* следующее дополнительное испытание.

Вода (2.5.12). Не более 0,1%, определение проводят с равным объёмом *метанола безводного Р.*

Фосфолипиды. *1064800.*

Определенное количество мозга человеческого или бычьего, хорошо отделённого от кровеносных сосудов, промывают и разжижают в подходящем устройстве. От 1000 г до 1300 г разжиженного вещества взвешивают, измеряют

объём (Кмл), затем экстрагируют тремя порциями, по 4 Кмл каждая, *ацетона Р,* и фильтруют при пониженном давлении; полученный остаток сушат при температуре 37°С в течение 18ч; затем остаток экстрагируют смесью растворителей *петролейный эфир Р2 - петролейный эфир Р1* (2:3), двумя порциями, каждая по 2 Vмл, фильтруя каждый экстракт через фильтровальную бумагу, предварительно увлажненную той же смесью растворителей. Объединённые извлечения выпаривают досуха при температуре 45°С под давлением не более 670 Па. Остаток растворяют в 0,2 Vмл *эфира Р* и выдерживают при температуре 4°С до образования осадка. Прозрачную надосадочную жидкость центрифугируют, выпаривают под низким давлением до объёма 100 мл на килограмм разжиженного вещества и взвешивают. Выдерживают при температуре 4°С до образования осадка (от 12 ч до 24 ч) и центрифугируют. К прозрачной надосадочной жидкости прибавляют *ацетон Р* в количестве, в пять раз превышающем ее объём, центрифугируют и отбрасывают надосадочную жидкость. Осадок сушат.

Хранят в эксикаторе под вакуумом, в защищённом от света месте.

Фосфора (V) оксид. P_2O_5. *(М.м.* 141,9). *1032900.* [1314-56-3]. Дифосфора пентоксид. Фосфорный ангидрид.

Аморфный порошок белого цвета, расплывающийся на воздухе. С водой образует гидраты с выделением тепла.

Хранят в воздухонепроницаемом контейнере.

Фосфорная кислота. H_3PO_4. *(М.м.* 98,0). *1065100.* [7664-38-2]. Кислота фосфорная концентрированная.

Содержит не менее 84,0% (*м/м*)и не более 90,0% (*м/м*) H_3PO_4.

Прозрачная бесцветная сиропообразная жидкость. Смешивается с водой и 96% спиртом. При хранении при низкой температуре может превращаться в кристаллическое вещество, которое не должно плавиться при температуре ниже 28°С.

d_{20}^{20}: около 1,7.

Хранят в стеклянных контейнерах.

Фосфорная кислота разведенная. *1065101.* Кислота фосфорная разведенная.

Содержит от 9,5% (*м/м*) до 10,5% (*м/м*) H_3PO_4.

К 885 г *воды Р* прибавляют 115 г *кислоты фосфорной концентрированной Р* и перемешивают.

Фосфорновольфрамовой кислоты раствор. *1065200.*

К 10 г *натрия вольфрамата Р* прибавляют 8 мл *кислоты фосфорной Р* и 75 мл *воды Р,* нагревают с обратным холодильником в течение 3 ч, охлаждают и доводят объём раствора *водой Р* до 100 мл.

Фосфорномолибденовая кислота. $12MoO_3 \cdot H_3P0_4 \cdot H_20$. *1064900.* [51429-74-4].

Мелкие кристаллы оранжево-жёлтого цвета. Легко растворима в воде, растворима в 96% спирте и эфире.

Фосфорномолибденовой кислоты раствор. *1064901.*

4 г *Фосфорномолибденовой кислоты Р* растворяют в *воде Р,* доводят объём раствора тем же растворителем до 40 мл. Осторожно при охлаждении прибавляют 60 мл *кислоты серной Р.*

Готовят непосредственно перед использованием.

Фосфорномолибденово-вольфрамовый реактив. *1065000.*

100 г *натрия вольфрамата Р* и 25 г *натрия молибдата Р* растворяют в 700 мл *воды Р,* прибавляют 100 мл *кислоты хлористоводородной* Р и 50 мл *кислоты фосфорной Р.* Смесь нагревают в стеклянной колбе с обратным холодильником в течение 10 ч, прибавляют 150 г *лития сульфата Р,* 50 *мл воды Р* и несколько капель *брома Р.* Кипятят до удаления избытка брома (15 мин), охлаждают, доводят объём раствора *водой Р* до 1000 мл и фильтруют.
Реактив должен иметь жёлтую окраску. Реактив не пригоден для использования, если приобретает зелёный оттенок, но может быть регенерирован путем кипячения с несколькими каплями *брома Р.* Избыток брома обязательно удаляют кипячением.

Хранятпри температуре от 2°C до 8°C.

Фосфорномолибденово-вольфрамовый реактив разведенный. *1065001.*

Смешивают *фосфорномолибденово-вольфрамовый реактив Р* с *водой Р(1:2).*

Фруктоза. $C_6H_{12}O_6$. *(М.м.* 180,2). *1106400.* [57-48-7].

(-)-D-*арабино*-гекс-2-улопираноза.

Белый кристаллический порошок с очень сладким вкусом. Очень легко растворима в воде, растворима в 96% спирте.

Фталазин. $C_8H_6N_2$. *(М.м.* 130,1). *1065400.* [253-52-1].

Кристаллы бледно-жёлтого цвета. Легко растворим в воде, растворим в этаноле, этилацетате и метаноле, умеренно растворим в эфире.

Температура плавления: от 89°C до 92°C.

Фталевая кислота. $C_8H_6O_4$. *(М.м.* 166,1). *1065600.* [88-99-3].

Бензол-1,2-дикарбоновая кислота.

Кристаллический порошок белого цвета. Растворима в горячей воде и 96% спирте.

Фталевый альдегид. $C_8H_6O_2$. *(М.м.* 134,1). *1065300.* [643-79-8].

Бензол-1,2-дикарбоксальдегид.

Кристаллический порошок жёлтого цвета или # чешуйки белого цвета.

Температура плавления: около 55°C.

Хранят в защищённом от света месте, без доступа воздуха.

Фталевого альдегида реактив. *1065301.*

2,47 г *кислоты борной Р* растворяют в 75 мл *воды Р,* доводят pH до 10,4 раствором 450 г/л *калия гидроксида Р* и доводят *водой Р* до объёма 100 мл.

1,0 г *фталевого альдегида Р* растворяют в 5 мл *метанола Р,* прибавляют 95 мл приготовленного раствора кислоты борной и 2 мл *кислоты тиогликолевой Р и* доводят pH до 10,4 раствором 450 г/л *калия гидроксида Р.*

Хранят в защищённом от света месте. Срок годности 3 сут.

Фталевый ангидрид. $C_8H_4O_3$. (*М.м.* 148,1). *1065700.* [85-44-9].

Изобензофуран-1,3-дион.

Содержит не менее 99,0 % $C_8H_4O_3$.

Хлопья белого цвета.

Температура плавления: от 130°C до 132°C.

Количественное определение. 2,000 г растворяют в 100 мл *воды Р,* кипятят с обратным холодильником в течение 30 мин, охлаждают и титруют *1 М раствором натрия гидроксида,* используя в качестве индикатора *раствор фенолфталеина Р.*

1 мл *1 М раствора натрия гидроксида* соответствует 74,05 мг $C_8H_4O_3$.

Фталевого ангидрида раствор. *1065701.*

42 г *фталевого ангидрида Р* растворяют в 300 мл *пиридина безводного Р* выдерживают в течение 16 ч.

Хранят в защищённом от света месте. Срок годности 7 сут.

Фталеиновый пурпурный. $C_{32}H_{32}N_2O_{12}\cdot H_2O$. *(М.м.* 637, для безводного). *1065500.* [2411-89-4]. Метилфталеин.

2,2',2'',2'''-[о-Крезолфталеин-3',3''-бис(метиленнитрило)]тетрауксусная кислота.

(1,3-Дигидро-3-оксо-изобензофуран-1-илиден)бис[(6-гидрокси-5-метил-3,1-фенилен)бис(метиленимино)диуксусная кислота].

Порошок от желтовато-белого до коричневатого цвета. Практически нерастворим в воде, растворим в 96% спирте. Реактив поступает в продажу в виде натриевой соли: порошок от желтовато-белого до коричневатого цвета; растворим в воде, практически не растворим в 96% спирте.

Испытание на чувствительность. 10 мг растворяют в 1 *мл раствора аммиака концентрированного Р* и доводят объём раствора *водой Р* до 100 мл. К 5 мл полученного раствора прибавляют 95 мл *воды Р,* 4 мл *раствора аммиака концентрированного Р,* 50 мл *96% спирта Р* и 0,1 мл *0.1 М раствора бария хлорида;* появляется сине-фиолетовое окрашивание, которое должно обесцветиться после прибавления 0,15 мл *0. 1М раствора натрия эдетата.*

2-Фтор-2-деокси-D-глюкоза. $C_6H_{11}FO_5$. *(М.м.* 182,2). *1113900.* [86783-82-6].

Кристаллический порошок.

Температура плавления: от 174°C до 176°C.

Фтординитробензол. $C_6H_3FN_2O_4$. *(М.м.* 186,1). *1038800.* [70-34-8].

1-Фтор-2,4-динитробензол.

Кристаллы бледно-жёлтого цвета. Растворим в эфире и пропиленгликоле.

Температура плавления: около 29°C.

1-Фтор-2-нитро-4-(трифторметил)бензол. $C_7H_3F_4NO_2$. *(М.м.* 209,1). *1038900.* [367-86-2].

Температура плавления: около 197°C.

Фтористоводородная кислота. HF. *(М.м.* 20,01). *1043600.* [7664-39-3].

Содержит не менее 40,0*% (м/м)* HF.

Прозрачная, бесцветная жидкость.

Остаток после прокаливания. Не более 0,05*% (м/м).*

Кислоту фтористоводородную выпаривают в платиновом тигле, остаток осторожно прокаливают до постоянной массы.

Количественное определение. В точно взвешенную колбу со стеклянной притёртой пробкой, содержащую 50,0 мл *1 М раствора натрия гидроксида,* помещают 2 г кислоты фтористоводородной и взвешивают. Титруют *0,5 М раствором кислоты серной,* используя в качестве индикатора 0,5 мл *раствора фенолфталеина Р.*

1 мл *1 М раствора натрия гидроксида* соответствует 20,01мг HF.

Хранят в полиэтиленовом контейнере.

Фукоза. $C_6H_{12}O_5$. *(М.м.* 164,2). *1039500.* [6696-41-9]. 6-Деокси-L-галактоза.

Порошок белого цвета. Растворима в воде и 96% спирте.

$[\alpha]_D^{20}$: около -76°. Определение проводят в растворе 90 г/л через 24 ч после приготовления.

Температура плавления: около 140°С.

Фуксин основной. *1039400.* [632-99-5]. Смесь розанилина гидрохлорида ($C_{20}H_{20}ClN_3$; *М.м.* 337,9; цветной индекс №42510; показатель Шульца №780) и пара-розанилина гидрохлорида ($C_{19}H_{18}ClN_3$; *М.м.* 323,8; цветной индекс №42500; показатель Шульца №779).

При необходимости очищают следующим образом: 1 г фуксина основного растворяют в 250 мл *кислоты хлористоводородной разведенной Р,* выдерживают в течение 2 ч при комнатной температуре, фильтруют, полученный фильтрат нейтрализуют *раствором натрия гидроксида разведенным Р* и прибавляют его избыток от 1 мл до 2 мл. Фильтруют через стеклянный фильтр (40), осадок промывают *водой Р,* растворяют в 70 мл *метанола Р,* предварительно нагретого до кипения, и прибавляют 300 мл *воды Р* при температуре 80°С. Охлаждают и фильтруют; кристаллы сушат в вакууме.
Кристаллы с зеленовато-бронзовым блеском.
Растворим в воде и 96% спирте.

Хранят в защищённом от света месте.

Фуксина обесцвеченный раствор. *1039401.*

0,1 г *фуксина основного Р* растворяют в 60 мл *воды Р,* прибавляют раствор, содержащий 1 г *натрия сульфита безводного Р* или 2 г *натрия сульфита Р* в 10 мл *воды Р.* Медленно, при постоянном перемешивании прибавляют 2 мл *кислоты хлористоводородной Р,* доводят объём раствора *водой Р* до 100 мл.

Выдерживают в защищённом от света месте не менее 12 ч, обесцвечивают *углем активированным Р* и фильтруют. Если раствор мутнеет, его фильтруют перед использованием. Если при выдерживании раствора появляется фиолетовое окрашивание, его снова обеспечивают *углем активированным Р.*

Испытание на чувствительность. К 1,0 мл прибавляют 1,0 мл *воды Р* и 0,1 мл *96% спирта, свободного от альдегидов, Р.* Прибавляй 0,2 мл раствора, содержащего 0,1 г/л формальдегида (CH_2O, *М.м.* 30,0). В течении 5 мин должно появиться светло-розовое окрашивание раствора.

Хранят в защищённом от света месте.

Фуксина обесцвеченный раствор Р1.*1039402!*

К 1 г *фуксина основного Р* прибавляют 100 *воды Р,* нагревают до температуры 50°С и охлаждают, периодически перемешивая. Выдерживают в течение 48 ч, перемешивают и фильтруют. К 4 мл фильтрата прибавляют 6 мл *кислоты хлористоводородной Р,* перемешивают и доводят объём раствора *водой Р до* 100 мл.

Раствор используют через 1 ч после приготовления.

Фурфурол. $C_5H_4O_2$. *(М.м.* 96,1). *1039600.* [98-01-1].

2-Фуральдегид. 2-Фуранкарбальдегид.

Прозрачная, маслянистая жидкость бесцветная или коричневато-жёлтого цвета. Смешивается с 11 частями воды, смешивается с 96% спиртом и эфиром.

d_{20}^{20}: от 1,155 до 1,161.

Температурные пределы перегонки (2.2.11). От 159°C и 163°C; должно перегоняться не менее 95 %.
Хранят в темном месте

Хинальдиновый красный. $C_{21}H_{23}IN_2$. *(М.м.* 430,3). *1073800.* [117-92-0].
2-[2-[4-(Диметиламино)фенил]этенил]-1-этилхинолина йодид.

Порошок тёмного синевато-чёрного цвета. Умеренно растворим в воде, легко растворим в 96% спирте.

Хинальдинового красного раствор. *1073801.*

0,1 г *Хинальдинового красного Р* растворяют в *метаноле Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 100 мл.

Изменение окраски. От бесцветной до красной в интервале рН 1,4-3,2.

Хингидрон. $C_{12}H_{10}O_4$. *(М.м.* 218,2). *1073900.* [106-34-3]. Эквимолекулярное соединение 1,4-бензохинона и гидрохинона.
Блестящие кристаллы или кристаллический порошок темно-зелёного цвета. Мало растворим в воде, умеренно растворим в горячей воде, растворим в 96% спирте, растворе аммиака концентрированного и эфире.

Температура плавления: около 170°C.

Хинидин. $C_{20}H_{24}N_20_2$. *(М.м.* 324,4). *1074000.* [56-54-2].

(S)-(6-Метоксихинол-4-ил) *[(2R,4S,5R)*-5-винилхинуклидин-2- ил] метанол.

Кристаллический порошок белого цвета. Очень мало растворим в воде, умеренно растворим в 96% спирте, мало растворим в эфире и метаноле.

$[\alpha]_D^{20}$: около +260°. Определение проводят, используя раствор 10 г/л в *этаноле Р.*

Температура плавления: около 172°C.

Хранят в защищённом от света месте.

Хинидина сульфат. $C_{40}H_{50}N_4O_8S{\cdot}2H_2O$. *(М.м.* 783). *1109500.* [6591-63-5]. Бис[(*S*)-[(2*R*,4*S*,5*R*)-5-этинил-1азабицикло[2.2.2]окт-2-ил](6-метоксиквинолин-4-ил)метанол] сульфат.

Содержит не менее 99,0% и не более 101,0% $C_{40}H_{50}N_4O_8S$ в пересчете на сухое вещество.

Белый или почти белый кристаллический порошок или шелковистый бесцветный игольчатый порошок. Мало растворим в воде, растворим в кипящей воде и 96% спирте, практически нерастворим в ацетоне.

Потеря в массе при высушивании (*2.2.32*). От 3,0% до 5,0%. Определяют из 1,000 г высушиванием при температуре 130°C.

Хранят в защищенном от света месте.

Хинин. $C_{20}H_{24}N_2O_2$ *(М.м.* 324,4). *1074100.* [130-95-0].

(R)-(6-Метоксихинол-4-ил)[(2S,4S,5R)-5-винилхинуклидин-2-ил]метанол.

Микрокристаллический порошок белого цвета. Очень мало растворим в воде, мало растворим в кипящей воде, очень легко растворим в этаноле, растворим в эфире.

$[a]_D^{20}$: около -167°. Определение проводят, используя раствор 10 г/л в *этаноле Р.*

Температура плавления: около 175°С.

Хранят в защищённом от света месте.

Хинина гидрохлорид. $C_{20}H_{25}ClN_2O_2 \cdot 2H_2O$.*(М.м.* 396,9). *1074200.* [6119-47-7].

(*S*)-[(2*S*,4*S*,5*R*)-5-этинил-1азабицикло[2.2.2]окт-2-ил](6-метоксиквинолин-4-ил)метанол] гидрохлорид.

Содержит не менее 99,0% и не более 101,0% $C_{20}H_{25}ClN_2O_2$ в пересчете на сухое вещество.

Тонкие шелковистые бесцветные иголки, часто в пучках. Растворим в воде, легко растворим в 96% спирте.

Потеря в массе при высушивании (2.2.32). От 6,0% до 10,0%. Определяют из 1,000 г высушивание от 100°С до 105°С.

Хранят в защищенном от света месте.

Хинина сульфат. $C_{40}H_{50}N_4O_8S \cdot 2H_2O$. *(М.м.* 783). *1074300.* [61 19-70-6]. Бис[(*R*)-[(2*S*,4*S*,5*R*)-5-этинил-1азабицикло[2.2.2]окт-2-ил](6-метоксиквинолин-4-ил)метанол] сульфат.

Содержит не менее 99,0% и не более 101,0% $C_{40}H_{50}N_4O_8S$ в пересчете на сухое вещество.

Белый или почти белый кристаллический порошок или тонкие бесцветные иголки. Мало растворим в воде, умеренно растворим в кипящей воде и 96% спирте.

Потеря в массе при высушивании (2.2.32). От 3,0% до 5,0%. Определяют из 1,000 г высушивание от 100°С до 105°С.

Хранят в защищенном от света месте.

2-Хлор-4-нитроанилин. $C_6H_5ClN_2O_2$. *(М.м.* 172,6). *1018800. [121-87-9].*

Кристаллический порошок жёлтого цвета. Легко растворим в метаноле.

Температура плавления: около 107°С.

Хранят в защищённом от света месте.

Хлоралгидрат. $C_2H_3Cl_3O_2$. *(М.м.* 165,4). *1017900.* [302-17-0].

2.2.2-трихлорэтан-1,1-диол.

Содержит не менее 98,5% и не более 101,0% $C_2H_3Cl_3O_2$.

Бесцветные прозрачные кристаллы. Очень легко растворим в воде, легко растворим в 96% спирте.

Хранят в плотно укупоренном контейнере.

Хлоралгидрата раствор. 1017901.

Раствор 80 г в 20 мл *воды Р.*

Хлоралгидрата раствор Р1.

20 г *хлоралгидрата Р* растворяют при нагревании в 5 мл *воды Р* и прибавляют 5 мл *глицерина Р*.

Хлорамин. $C_7H_7ClNNaO_2S \cdot 3H_2O$. *(М.м.* 281,7). *1018000.* [127-65-1].

Натрий N-хлор-4-метилбензен-сульфонимид тригидрат.

Содержит не менее 98,0% и не более 103,0% $C_7H_7ClNNaO_2S \cdot 3H_2O$.

Белый или слегка желтый кристаллический порошок. Легко растворим в воде, растворим в 96% спирте, практически нерастворим в эфире.

Хранят в плотно укупоренном контейнере, в защищенном от света месте при температуре от 8°С до 15°С.

Хлорамина раствор. *1018001.*

Раствор 20 г/л.
Готовят непосредственно перед использованием.

Хлорамина раствор Р1. *1018002.*

Раствор 0.1 г/л *хлорамина Р.*
Готовят непосредственно перед использованием.

Хлорамина раствор Р2. *1018003.*

Раствор 0.2 г/л.
Готовят непосредственно перед использованием.

Хлоранилин. C_6H_6ClN. *(М.м.* 127,6). *1018300.* [106-47-8]. 4-Хлоранилин.

Кристаллы. Растворим в горячей воде, легко растворим в 96% спирте и эфире.

Температура плавления: около 71°С.

Хлорацетанилид. C_8H_8ClNO. *(М.м.* 169,6). *1018100.* [539-03-7]. 4'-Хлорацетанилид.

Кристаллический порошок. Практически нерастворим в воде, растворим в 96% спирте.
Температура плавления: около 178°С.

4-Хлорбензолсульфонамид. $C_6H_6ClNO_2S$. *(М.м.* 191,6). *1097400.* [98-64-6].

Порошок белого цвета. Температура плавления: около 145°С.

Хлорбутанол. $C_4H_7Cl_3O$. *(М.м.* 177,5). *1018400.* [57-15-8]. 1,1,1-трихлор-2-метилпропан-2-ол.

Содержит не менее 98,0% и не более 101,0% $C_4H_7Cl_3O$ в пересчете на безводное вещество.

Белый кристаллический порошок или бесцветные кристаллы. Легко сублимируется. Мало растворим в воде, очень легко растворим в 96% спирте и эфире, растворим в глицерине (85%).

Температура плавления: около 95°С., определяемая без предварительного высушивания.

Вода (2.5.12). Не более 1,0%. Определяют из навески 2,00 г полумикрометодом.

Хлористоводородная кислота. HCl. (*М.м.* 36,46).*1043500.* [7647-01-0].

Бесцветная прозрачная, дымящая жидкость. Смешивается с водой.

d_{20}^{20}: около 1,18.

Количественное определение. В точно взвешенную колбу с притертой пробкой, содержащей 30 мл *воды Р*, вносят 1,5 мл кислоты хлористоводородной и точно взвешивают. Титруют *1 М раствором натрия гидроксида*, используя в качестве индикатора *раствор метилового красного Р*.

1 мл *1М раствора натрия гидроксида* соответствует 36,46 мг HCl.

Хранят в укупоренных контейнерах, изготовленных из стекла или других инертных материалов при температуре ниже 30° С.

Хлористоводородная кислота Р1.*1043501.*

Содержит 250 г/л HCl.

70 г *кислоты хлористоводородной Р* доводят *водой Р до* объёма 100 мл.

Хлористоводородная кислота бромированная. *1043507.*

К 100 мл *кислоты хлористоводородной Р* прибавляют 1 мл *раствора брома Р.*

Хлористоводородная кислота разведенная. *1043503.*

Содержит 73 г/л HCl.

20 г *кислоты хлористоводородной Р* доводят *водой Р* до объёма 100 мл.

Хлористоводородная кислота разведенная Р1. *1043504*

Содержит 0,37 г/л HCl.

1,0 мл *кислоты хлористоводородной разведенной Р* доводят *водой Р* до объёма 200,0 мл.

Хлористоводородная кислота разведенная Р2. *1043505.*

30 мл *1М раствора кислоты хлористоводородной* доводят *водой Р* до объёма 1000 мл; pH раствора 1,6±0,1.

Хлористоводородной кислоты раствор в спирте. *1043506.*

5,0 мл *1М раствора кислоты хлористоводородной* доводят *96% спиртом Р* до объёма 500,0 мл.

Хлористоводородная кислота, свободная от свинца. *1043508.*

Должна выдерживать требования для *кислоты хлористоводородной Р* и следующее дополнительное испытание.
Свинец (2.2.22, метод I). Не более 20 ppm, определение проводят методом атомно-эмиссионной спектрометрии.

Испытуемый раствор. 200 г кислоты хлористоводородной помещают в кварцевый тигель, испаряют почти досуха, к полученному остатку прибавляют 5 мл кислоты азотной, приготовленной дистилляцией *кислоты азотной Р* при температуре ниже температуры кипения, и выпаривают досуха. К полученному остатку прибавляют 5 мл кислоты азотной, приготовленной дистилляцией *кислоты азотной Р* при температуре ниже температуры кипения.

Растворы сравнения. Готовят растворы сравнения, используя *эталонный раствор свинца (0,1 ppm Pb) Р,* разведенный кислотой азотной, приготовление дистилляцией *кислоты азотной Р* при температуре ниже температуры кипения.

Измеряют интенсивность эмиссии при длине волны 220,35 нм

Хлорная кислота. $HClO_4$. *(М.м.* 100,5). *10629* [7601-90-3].

Содержит не менее 70,0% *(м/м)* и не более 73,0% *(м/м)* $HClO_4$.

Прозрачная, бесцветная жидкость. Легко смешивается с водой.

d_{20}^{20}: около1,7.

Количественное определение. 2,50 г кислоты хлорной прибавляют к 50 мл *воды Р* и титруют *1 М раствором натрия гидроксида,* используя в качест индикатора 0,1 мл *раствора метилового красного.*

1 мл *1 М раствора натрия гидроксида* соответствует 100,5 мг $HClO_4$.

Хлорной кислоты раствор. *1062901.*

8,5 мл *кислоты хлорной Р* доводят *водой Р* до объёма 100 мл.

Хлорогеновая кислота. $C_{16}H_{18}O_9$. *(М.м.* 354,3). *1104700.* [327-97-9].

(1S,3R,4R,5R)-3-[(3,4-Дигидроксициннамоил)окси]-1,4,5-тригидроксициклогексанкарбоновая кислота.

Кристаллический порошок белого цвета. Растворима в воде, ацетоне и этаноле.

Температура плавления: около 208°С.

$[a]_D^{26}$: около – 35,2°.

Хроматография. Определение проводят как указано в статье *Сухой экстракт листьев беладонны, стандартизированный* в условиях описанных в «Идентификации А»; на хроматограмме должно обнаруживаться только одно пятно.

Хлороформ. $CHCl_3$. (*М.м.* 119,4). 1018600. [67-66-3]. Трихлорметан.

Прозрачная, бесцветная жидкость. Мало растворим в воде, смешивается с 96% спиртом.

d_{20}^{20}: от 1,475 до 1,481.

Температура кипения: около 60°С.

Хлороформ содержит от 0,4% (м/м) до 1,0% (м/м) этанола.

Этанол. 1,00 г хлороформа помещают в колбу с притёртой стеклянной пробкой, прибавляют 15,0 мл *нитрохромового реактива Р*, в колбу закрывают, энергично встряхивают в течение 2 мин и выдерживают в течение 15 мин. Прибавляют 100 мл *воды Р* и 5 мл раствора 200 г/л *калия йодида Р*. Через 2 мин титруют *0,1 М раствором натрия тиосульфата* до получения светло-зелёного окрашивания, используя в качестве индикатора 1 мл *раствора крахмала Р*. Проводят контрольный опыт.

Содержание этанола (X), в процентах, вычисляют по формуле:

$$\frac{(n_2 - n_1) \cdot 0{,}115}{m},$$

где:

n_1 – объём 0,1 *М раствора натрия тиосульфата*, израсходованный на титрование испытуемого раствора, в миллилитрах;

n_2 – объём *0,1 М раствора натрия тиосульфата*, израсходованный на титрование контрольного опыта, в миллилитрах;

m – масса навески хлороформа, в граммах.

Хлороформ подкисленный. 1018601.

К 100 мл *хлороформа Р* прибавляют 10 мл *кислоты хлористоводородной Р*, встряхивают, отстаивают и разделяют два слоя.

Хлороформ, свободный от этанола. 1018602.
200 мл *хлороформа Р* промывают *водой Р*, встряхивая с четырьмя порциями по 100 мл каждая. Сушат над 20 г *натрия сульфата безводного Р* в течение 24 ч. Фильтрат перегоняют над 10 г *натрия сульфата безводного Р*, отбрасывая первые 20 мл отгона.
Готовят непосредственно перед использованием.

Хлороформ, стабилизированный амиленом. $CHCl_3$. (М.М. 119,4). 1018700.
Прозрачная, бесцветная жидкость. Мало растворим в воде, смешивается с 96% спиртом.
Вода. Не более 0,05%.
Остаток после выпаривания. Не более 0,001%.
Минимальное пропускание (*2.2.25*) определяют, используя в качестве компенсационной жидкости *воду Р*:
Не менее 50% при длине волны 255 нм,
Не менее 80% при длине волны 260 нм,
Не менее 98% при длине волны 300 нм.
Количественное определение. Не менее 99,8% $CHCl_3$. Определение проводят методом газовой хроматографии.

Хлорплатиновая кислота. $H_2Cl_6Pt,6H_2O$. (*М.м.* 517,9). 1019000. [18497-13-7].
Гексахлорплатиновая (IV) кислота.
Содержит не менее 37,0% (м/м) платины (*А.м.* 195,1).
Кристаллы или кристаллическая масса коричневато-красного цвета. Очень легко растворима в воде, растворима 96% спирте.
Количественное определение. 0,200 г кислоты хлорплатиновой прокаливают при температуре 900°С до постоянной массы и взвешивают остаток (платины).
Хранят в защищённом от света месте.

3-Хлорпропан-1,2-диол. $C_3H_7ClO_2$, (*М.м.* 110,5). 1097600. [96-24-2].
Бесцветная жидкость. Растворим в воде, 96% спирте и эфире.
d_{20}^{20}: около 1,322.
n_D^{20}: около 1,480.
Температура кипения: около 213°С.

5-Хлорсалициловая кислота. $C_7H_5ClO_3$. (*М.м.* 172,6). 11019100. [321-14-2].
Кристалический порошок белог оили посчти белого цвета. Растворима в метаноле.
Температура плавления: около 173°С.

Хлортиазид. $C_7H_6ClN_3O_4S_2$. (*М.м.* 295,7). 1112100. [58-94-6].
6-хлор-2*Н*-1,2,4-бензотиадиазин-7-сульфонамид 1,1-диоксид.
Содержит не менее 98,0% и не более 102,0% $C_7H_6ClN_3O_4S_2$ в пересчете на сухое вещество.
Белый или почти белый кристаллический порошок. Очень мало растворим в воде, умеренно растворим в ацетоне, мало растворим в 96% спирте. Растворяется в разведенных растворах щелочных гидроксидов.
Потеря в массе при высушивании (2.2.32). Не более 1,0%. Определяют из навески 1,000 г высушиванием при температуре 100°С- 105°С.

Хлортриметилсилан. C_3H_9ClSi. (*М.м.* 108,6). 1019300 [75-77-4].
Прозрачная, бесцветная жидкость, дымящаяся на воздухе.

d_{20}^{20}: около 0,86.

n_D^{20}: около 1,388.

Температура кипения: около 57°C.

Хлоруксусная кислота. $C_2H_3ClO_2$. *(М.м.* 94,5). *1018200.* [79-11-8].

Бесцветные или белого цвета кристаллы, расплывающиеся на воздухе. Очень легко растворима в воде, растворима в 96% спирте и эфире.

Хранят в воздухонепроницаемом контейнере.

Хлорфенол. C_6H_5ClO. *(М.м.* 128,6). *1018900.* [106-48-9]. 4-Хлорфенол.

Бесцветные или почти бесцветные кристаллы. Мало растворим в воде, очень легко растворим в 96% спирте, эфире и растворах гидроксидов щелочных металлов.

Температура плавления: около 42°C.

2-Хлорэтанол. C_2H_5ClO. *(М.м.* 80,5). *1097500.* [107-07-3].

Бесцветная жидкость. Растворим в 96% спирте.

d_{20}^{20}: около 1,197.

n_D^{20}: около 1?442.

Температура кипения: около 130°C.

Температура плавления: около -89°C.

2-Хлорэтанола раствор. *1097501.*

125 мг *2-хлорэтанола Р* растворяют в *2-пропаноле Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 50 мл. 5 мл полученного раствора доводят *2-пропанолом Р до* объёма 50 мл.

(2-Хлорэтил)диэтиламина гидрохлорид. $C_6H_{15}Cl_2N$. *(М.м.* 172,1). *1018500.* [869-24-9].

Кристаллический порошок белого цвета, Очень легко растворим в воде и метаноле, легко растворим в метиленхлориде, практически не растворим в гексане.

Температура плавления: около 211°C.

Холестерин. $C_{27}H_{46}O$. *(М.м.* 386,7). *1019400.* [57-88-5].

Содержит не менее 95,0% холест-5-ен-3b -ола и не менее 97,0% и не более 103,0% стеролов в пересчете на сухое вещество.

Белый или почти белый кристаллический порошок. Практически не растворимв воде, умеренно растворим в ацетоне и 96% спирте. Чувствителен к свету.

Хранят в защищенном от света месте.

Холина хлорид. $C_5H_{14}ClNO$. *(М.м.* 139,6). *1019500.* [67-48-1].

(2-Гидроксиэтил)триметиламмония хлорид.

Кристаллы, расплывающиеся на воздухе. Очень легко растворим в воде и 96% спирте.

Хроматография. Определение проводят, как указано в статье *Суксаметония хлорид,* используя 5 мкл раствора 0,2 г/л в *метаноле Р;* на хроматограмме должно обнаруживаться только одно основное пятно.

Хранят в воздухонепроницаемом контейнере.

Хрома (III) трихлорид гексагидрат. $[Cr(H_2O)_4Cl_2]Cl \cdot 2H_2O$. *(М.м.* 266,5). *1104800* [10060-12-5].

Кристаллический порошок тёмно-зелёного цвета, гигроскопичен.

Хранят в сухом месте, защищая от действия окислителей.

Хрома (VI) оксид. CrO_3. *(М.м.* 100,0). *1019900.* [1333-82-0]. Хрома триоксид.

Игольчатые кристаллы или гранулы тёмного коричневато-красного цвета, расплывающиеся на воздухе. Очень легко растворим в воде.

Хранят в воздухонепроницаемом контейнере.

Хромазурол S. $C_{23}H_{13}Cl_2Na_3O_9S$. *(М.м.* 605). *1019600* [1667-99-8]. Показатель Шульца №841. Цветной индекс №43825. Тринатрия 5-[(3-карбоксилато-5-метил-4-оксоциклогекса-2,5-диен-1-или-ден)(2,6-дихлор-3-сульфонатофенил)метил]-2-гидрокси-3-метилбензоат.

Порошок коричневато-чёрного цвета. Растворим в воде, мало растворим в 96% спирте.

Хрома-калия сульфат. $CrK(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$. *(М.м.* 499,4). *1019800.* [7788-99-0]. Хромовые квасцы.

Крупные кристаллы от фиолетово-красного до чёрного цвета. Легко растворим в воде, практически не растворим в 96% спирте.

Хромовая смесь. *1019700.*

Насыщенный раствор *хрома (VI) оксида Р* в *кислоте серной Р.*

Хромовые квасцы. См. *Хрома-калия сульфат.*

Хромоген черный. См. *Протравной черный 11.*

Хромотроп II В. $C_{16}H_9N_3Na_2O_{10}S_2$. *(М.м.* 513,4) *1020200.* [548-80-1]. Показатель Шульца №*67.* Цветной индекс №16575. Динатрия 4,5-дигидрокси-3-(4-нитрофенилазо)нафталин -2,7-дисульфонат.
Порошок красновато-коричневого цвета. Растворим в воде с образованием желтовато-красного раствора, практически нерастворим в 96% спирте.

Хромотропа II В раствор. *1020201.* Раствор 0,05 г/л в *кислоте серной Р.*

Хромотроповая кислота. $C_{10}H_8O_8S_2$. *(М.м.* 320,3).1119100. [148-25-4].

4,5-Дигидрокси-2,7-нафтилиндисульфоновая кислота.

Игольчатые кристаллы белого цвета. Растворима в воде.

Температура плавления: около 300°С.

Хромотроповой кислоты раствор.

0,50 г *кислоты хромотроповой Р* растворяют примерно в 80 мл *воды Р* и доводят тем же растворителем до объёма 100 мл.

Срок годности раствора 24 ч.

Хромотроповой кислоты натриевая соль. $C_{10}H_6Na_2O_8S_2 \cdot 2H_2O$. *(М.м.* 400,3). *1020300.* [5808-22-0]. Показатель Шульца №1136.

Динатрия-1,8-дигидроксинафталин-3,6-дисульфонат дигидрат.

Порошок желтовато-белого цвета. Растворима в воде, практически нерастворима в 96% спирте.

Хромотроповая кислота натриевой соли раствор. 1020301.

0,60 г *хромотроповой кислоты натриевой соли Р* растворяют в 80 мл *воды Р* и доводят объём раствора тем самым растворителем до 100 мл. раствор используют протяжение 24 ч.

Хромоформный субстрат Р1. *1020000.*

N-α -бензилоксикарбонил-D-аргинил-L-глицил-L-аргинин-4-нитроанилида дигидрохлорид растворяют в *воде Р до* получения 0,003 М раствора. Перед использованием разводят *буферным раствором трис(гидроксиметил)аминометана-EDTA pH 8,4 Р до* получения 0,0005 М раствора.

Хромоформный субстрат Р2. *1020100.*

D-фенилаланил-L-пипеколил-L-аргинин-4-нитроанилида дигидрохлорид растворяют в *воде Р* до получения 0,003 М раствора. Перед использованем разводят *буферным раствором трис(гидроксиметил)аминометана-EDTA pH 8,4 Р* до получения 0,0005 М раствора.

Цезия хлорид. CsCl. *(М.м.* 168,4). *1014200.* [7647-17-8].

Порошок белого цвета. Очень легко растворим в воде, легко растворим в метаноле, практически нерастворим в ацетоне.

Целлюлоза для хроматографии. *1016800.* [9004-34-6].

Мелкий гомогенный порошок белого цвета со средним размером частиц менее 30 мкм.

Приготовление тонкого слоя. 15 г суспендируют в 100 мл *воды Р* и гомогенизируют на электромешалке в течение 60 с. Тщательно очищенные пластины покрывают слоем толщиной 0,1 мм, используя прибор для нанесения. Сушат на воздухе.

Целлюлоза для хроматографии Р1. *1016900.*

Микрокристаллическая целлюлоза. Мелкий гомогенный порошок белого цвета со средним размером частиц менее 30 мкм.

Приготовление тонкого слоя. 25 г суспендируют в 90 мл *воды Р* и гомогенизируют на электромешалке в течение 60 с. Тщательно очищенные пластины покрывают слоем толщиной 0,1 мм, используя прибор для нанесения. Сушат на воздухе.

Целлюлоза для хроматографии F_{254}. *1017000.*

Микрокристаллическая целлюлоза $F_{254.}$ Тонкий гомогенный порошок белого цвета со средним размером частиц менее 30 мкм, содержащий флуоресцентный индикатор с оптимальной интенсивностью поглощения при длине волны 254 нм.

Приготовление тонкого слоя. 25 г суспендируют в 100 мл *воды Р* и гомогенизируют на электромешалке в течение 60 с. Тщательно очищенные пластины покрывают слоем толщиной 0,1 мм, используя прибор для нанесения. Сушат на воздухе.

Церия (III) нитрат. $Ce(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$. *(М.м.* 434,3). *1017400.* [10294-41-4]. Церия тринитрат гексагидрат.

Кристаллический порошок от бесцветного до слабо-жёлтого цвета. Легко растворим в воде и 96% спирте.

Церия (IV) сульфат. $Ce(SO_4)_2 \cdot 4H_2O$. *(М.м.* 404,3). *1017300.* [123333-60-8]. Церий сернокислый.

Кристаллический порошок или кристаллы жёлтого или оранжево-жёлтого цвета. Очень мало растворим в воде, медленно растворим в разведенных кислотах.

Цетилтриметиламмония бромид. $C_{19}H_{42}BrN$. *(М.м.* 364,5). *1017700.* [57-09-0]. Цетримония бромид. N-Гексадецил-N,N,N-триметиламмония бромид.

Кристаллический порошок белого цвета. Растворим в воде, легко растворим в 96% спирте.

Температура плавления: около 240°C.

Цетримид. *1017600.* [8044-71-1].

Состоит из триметилтетрадециламмония бромида и может содержать незначительные количества додецил-и гексадецил-триметиламмония бромиды.

Содержит не менее 96,0% и не более 101,0% алкилтриметиламмония бромидов, рассчитанных как $C_{17}H_{38}BrN$ (*М.м.* 336,4) в пересчете на сухое вещество.

Белый или почти белый объемный порошок. Легко растворим в воде и 96% спирте, практически нерастворим в эфире.

Потеря в массе при высушивании (2.2.32). Не более 2,0%. Определяют из навески 1,000 г высушиванием при температуре 100°С-105°С в течение 2 ч.

Цефалина реактив. *1017200.*

К 0,5 — 1 г *мозга бычьего, высушенного в ацетоне Р,* прибавляют 20 мл *ацетона Р* и оставляют на 2 ч. Центрифугируют с ускорением 500 g в течение 2 мин, жидкость над осадком сливают. Остаток сушат при пониженном давлении, затем прибавляют 20 мл *хлороформа Р* и оставляют на 2 ч, часто взбалтывая. Фильтруют или центрифугируют и выпаривают хлороформ при пониженном давлении. Остаток суспендируют в 5 — 10 мл раствора 9 г/л *натрия хлорида Р.*

Растворители, используемые для приготовления реактива, должны содержать подходящий антиоксидант, например, 0,02 г/л *бутилированного гидроксианизола.*

Хранят в замороженном или лиофиллизированном виде.

Срок годности 3 мес.

Цефалина дигидрохлорид. $C_{28}H_{40}Cl_2N_2O_4 \cdot 7H_2O$. *(М.м.* 666). *1017100.* [5884-43-5]. (R)-1-[(2S,3R,11ЬS)-3-Этил-1,3,4,6,7,11Ь-гекса-гидро-9,10-диметокси-2H-бензо[a]хинолизин-2-илметил]-1,2,3,4-тетрагидро-7-метоксиизохинолин-6-ол дигидрохлорид гептагидрат.

Кристаллический порошок от белого до желтоватого цвета. Легко растворим в воде, растворим в ацетоне и 96% спирте.

$[a]_D^{20}$: около +25°. Определение проводят, используя раствор 20 г/л.

Цианобромида раствор. *1023700.* [506-68-3].

К *бромной воде Р* прибавляют по каплям при охлаждении *0,1 М раствор аммония тиоцианата* до исчезновения жёлтой окраски.

Готовят непосредственно перед использованием.

Цианогуанидин. $C_2H_4N_4$. *(М.м.* 84,1). *1023800.* [461-58-5]. Дициандиамид.

1-Цианогуанидин.

Кристаллический порошок белого цвета. Умеренно растворим в воде и 96% спирте, практически не растворим в эфире и метиленхлориде.

Температура плавления: около 210°C.

Цианокобаламин. $C_{63}H_{88}CoN_{14}O_{14}P$. *(М.м.* 1355). *1023600.* [68-19-9].

a -(5,6-диметилбензимидазол-1-ил)кобамида цианид.

Содержит не менее 96,0% и не более 102,0% $C_{63}H_{88}CoN_{14}O_{14}P$ в пересчете на сухое вещество.

Темно-красный кристаллический порошок или темно-красные кристаллы. Умеренно растворимв в воде и 96% спирте, практически нерастворим в ацетоне и эфире. Безводная субстанция очень гигроскопична.

Потеря в массе при высушивании (2.2.32). Не более 12,0%. Определяют из навески 20,00 мг, высушивая под вакуумом при температуре 100°C-105°C в течение 2 ч.

Хранят в плотно укупоренном контейнере, в защищенном от свта месте.

Цианоуксусная кислота. $C_3H_3NO_2$. *(М.м.* 85,1). *1097900.* [372- 09-8].

Гигроскопичные кристаллы белого или желтовато-белого цвета. Растворима в воде.
Хранят в воздухонепроницаемом контейнере.

Циклогексан. C_6H_{12}. *(М.м.* 84,2). *1023900.* [110-82-7].

Прозрачная, бесцветная, воспламеняющаяся жидкость. Практически нерастворим в воде, смешивается с органическими растворителями.

d_{20}^{20}: около 0,78.

Температура кипения: около 80,5°C.

Циклогексан, используемый в спектрофотометрии, должен выдерживать следующее дополнительное испытание.

Минимальное пропускание (2.2.25) определяют, используя в качестве компенсационной жидкости *воду Р:*

45% при длине волны 220 нм,

70% при длине волны 235 нм,

90% при длине волны 240 нм,

98% при длине волны 250 нм.

Циклогексан Р1. *1023901.*

Должен выдерживать требования для *циклогексана Р и* следующее дополнительное испытание.

Интенсивность поглощения, измеренная при длине волны 460 нм (при облучении пучком света с длиной волны 365нм),не должна быть интенсивнее поглощения раствора 0,002 ppm *хинина Р в 0,05 М растворе кислоты серной.*

Циклогексиламин. $C_6H_{13}N$. *(М.м.* 99,2). *1024000.* [108-91-8].

Бесцветная жидкость. Растворим в воде, смешивается с наиболее распространёнными растворителями.

n_{20}^{20}: около 1,460.

Температура кипения: от 134°C до 135°C.

Циклогексилендинитрилтетрауксусная кислота. $C_{14}H_{22}N_2O_8 \cdot H_2O$. *(М.м.* 364,4). *1024100. транс-*Циклогексилен-1,*2-динитрило-N,N,N',N'-* тетрауксусная кислота.

Кристаллический порошок белого цвета.

Температура плавления: около 204°С.

3-Циклогексилпропионовая кислота. $C_9H_{16}0_2$. *(М.м.* 156,2). *1119200.* [701- 97-3].

Бесцветная жидкость.

d_{20}^{20}: около 0,998.

n_{20}^{20}: около 1,4648.

Температура кипения: около 130°С.

Цитратный буферный раствор рН 5,0. 4010700

Готовят раствор, который содержит 20,1 г/л *кислоты лимонной Р* и 8.0 г/л *натрия гидрооксида Р*. Востанавливают рН с помощью кислоты *хлористоводородной разведённой Р*.

Цинеол. $C_{10}H_{18}O$. (*М.м.* 154,3). *1020600.* [470-82-6]. 1,8-Цинеол. Эвкалиптол.

1,8-Эпокси-n-ментан.

Бесцветная жидкость. Практически нерастворим в воде. Смешивается с этанолом и эфиром.

d_{20}^{20}: от 0,922 до 0,927.

n_{20}^{20}: от 1,456 до 1,459.

Температура затвердевания (2.2.18). От О°С до 1°С.

Температурные пределы перегонки (2.2.11). От 174°С до177°С.

Фенол. 1 г встряхивают с 20 мл *воды Р.* После разделения слоев к 10 мл водного слоя прибавляют *0,1 М раствора железа (III) хлорида Р1.* Раствор не должен окрашиваться в фиолетовый цвет.

Терпентинное масло. 1 г цинеола растворяют в 5 мл *спирта (90%, об/об) Р,* по каплям прибавляют свежеприготовленную *бромную воду Р.* Для получения жёлтого окрашивания, не исчезающего в течение 30 мин, должно быть израсходовано не более 0,5 мл.

Остаток после выпаривания. Не более 0,05%. К 10,0 мл прибавляют 25 мл *воды Р,* выпаривают на водяной бане, остаток сушат до постоянной массы при температуре от 100°С до 105°С.

Цинеол, применяемый в газовой хроматографии, должен выдерживать следующее дополнительное испытание.

Количественное определение. Проводят методом газовой хроматографии *(2.2.28),* как указано в статье *Масло мяты перечной,* используя цинеол в качестве испытуемого раствора.

Площадь основного пика должна быть не менее 98,0% суммы площадей всех пиков.

Цинк. Zn. *(А.м.* 65,4). *1096500.* [7440-66-6].

Содержит не менее 99,5% Zn.

Цилиндры, или гранулы, или шарики серебристо-белого цвета, или стружка с синим блеском.

Мышьяк (2.4.2, метод А). Не более 0,00002% (0,2ppm). 5,0 г цинка растворяют в смеси 15 мл *кислоты хлористоводородной Р* и 25 мл *воды Р;* полученный раствор должен выдерживать испытание на мышьяк.

Цинк активированный. *1096501.*

Цинк в виде цилиндров или шариков помещают в коническую колбу, прибавляют достаточное количество 50 ppm раствора *кислоты хлорплатиновой Р,* чтобы полностью покрыть металл, через 10 мин металл промывают водой, удаляют воду и немедленно сушат.

Мышьяк. К 5 г цинка активированного прибавляют 15 *мл кислоты хлористоводородной Р,* 25 мл *воды Р,* 0.1 *мл раствора олова(II) хлорида Р* и 5 мл *раствора калия йодида Р.* Далее поступают, как указано в испытании на мышьяк *(2.4.2, метод А).* На *ртутно-бромидной бумаге Р* не должно наблюдаться окрашивания.

Активность. Повторяют испытание на мышьяк, используя те же реактивы, прибавляют раствор, содержащий 1 мкг мышьяка. На *ртутно-бромидной бумаге Р* появляется заметное окрашивание.

Цинка ацетат. $(C_2H_3O_2)_2Zn \cdot 2H_2O$. *(М.м.* 219.5). *1102300.* [5970-45-6].

Цинка ацетат дигидрат.

Блестящие кристаллы белого цвета, слегка выветривающиеся на воздухе. Легко растворим в воде, растворим в 96% спирте.

При температуре 100°С теряет кристаллизационную воду.

d_{20}^{20}: около 1,735.

Температура плавления: около 237°С.

Цинка ацетата раствор. *1102301.*

54,9 г *цинка ацетата Р* растворяют при перемешивании в смеси 600 мл *воды Р* и 150 мл *кислоты уксусной ледяной Р.* При перемешивании прибавляют 150 *мл раствора аммиака концентрированного Р,* охлаждают до комнатной температуры и доводят рН до 6,4 *раствором аммиака Р,* доводят объём раствора *водой Р* до 1 л.

Цинка оксид. ZnO. (*М.м.* 81,4). *1096700.* [1314-13-2].

Содержит не менее 99,0% и не более 100,5% ZnO в пересчете на прокаленное вещество.

Мягкий белый или слабо желтовато-белый аморфный порошок, не содержащий твердых частиц. Практически нерастворим в воде и 96% спирте, растворяется в разведенных минеральных кислотах.

Потеря в массе при прокаливании. Не более 1,0%. Определяют из навески 1,00 г при температуре 500°С.

Цинка порошок. Zn. *(А.м.* 65,4). *1096800.* [7440-66-6].

Содержит не менее 90,0% Zn *(А.м.* 65,4).

Очень мелкий порошок серого цвета. Растворим в *кислоте хлористоводородной разведенной Р.*

Цинка сульфат. $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$. (*М.м.* 287,5). *1097000.* [7446-20-0].
Содержит не менее 99,0% и не более 104,0% $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$.

Белый кристаллический порошок или бесцветные прозрачные кристаллы, выветривающиеся на воздухе. Очень легко растворим в воде, практически нерастворим в 96% спирте.
Хранят в неметаллических контейнерах.

Цинка хлорид. $ZnCl_2$. (*М.м.* 136,3). *1096600.* [7646-85-7].

Содержит не менее 95,0% и не более 100,5% $ZnCl_2$.

Белый кристаллический порошок или в виде белых палочек. Расплывается на воздухе.

Очень легко растворим в воде, легко растворим в 96% спирте и глицерине.

Хранят в неметаллических контейнерах.

Цинка хлорида раствор в кислоте муравьиной. *1096601*

20 г *цинка хлорида Р* растворяют в 80 г раствора 850 г/л *кислоты муравьиной безводной Р.*

Цинка хлорида раствор йодированный. *1096602.*

20 г *цинка хлорида Р* и 6,5 г *калия иодида Р* растворяют в 10,5 мл *воды Р,* прибавляют 0,5 г *йода Р* и встряхивают в течение 15 мин. Если необходимо, фильтруют.

Хранят в защищённом от света месте.

Цинка йодида и крахмала раствор. *1096502.*

К раствору 2 г *цинка хлорида Р* в 10 мл *воды Р* прибавляют 0,4 г *крахмала растворимого Р* и нагревают до растворения крахмала. После охлаждения до комнатной температуры прибавляют 1,0 мл бесцветного раствора, содержащего 0,10 г *цинка Р* в виде опилок и 0,2 г *йода Р* в *воде Р,* доводят объём раствора *водой Р* до 100 мл, фильтруют.

Хранят в защищённом от света месте.

Испытание на чувствительность. 0,05 *мл раствора натрия нитрита Р* доводят *водой Р* до объёма 50 мл. К 5 мл полученного раствора прибавляют 0,1 мл *кислоты серной разведенной Р* и 0,05 мл приготовленного раствора цинка йодида и крахмала и смешивают; раствор окрашивается в синий цвет.

Цинхонидин. $C_{19}H_{22}N_2O$. *(М.м.* 294,4). *1020400.* [485-71-2].

(R)-(Хинол-4-ил)[(2R,4S,5R)-5-винилхинуклидин-2-ил]метанол.

Кристаллический порошок белого цвета. Очень мало растворим в воде и петролейном эфире, умеренно растворим в 96% спирте, мало растворим в эфире.

$[\alpha]_D^{20}$: от -105° до -110°. Определение проводят, используя раствор 50 г/л в *96% спирте Р.*

Температура плавления: около 208°С с разложением.

Хранят в защищённом от света месте.

Цинхонин. $C_{19}H_{22}N_2O$. *(М.м.* 294,4). *1020500.* [118-10-5].
(S)-(Хинол-4-ил)[(2R,4S,5R)-5-винилхинуклидин-2-ил]метанол.

Кристаллический порошок белого цвета. Мало растворим в воде, умеренно растворим в 96% спирте и метаноле, мало растворим в эфире.

$[\alpha]_D^{20}$: от +225° до +230°. Определение проводят используя раствор 50 г/л в *96% спирте Р.*

Температура плавления: около 263°С.

Хранят в защищённом от света месте.

Цирконила нитрат. Основная соль, состав которой приблизительно соответствует формуле $ZrO(NO_3)_2 \cdot 2H_2O$. *1097200.* [14985-18-3].

Кристаллический порошок или кристаллы белого цвета. Гигроскопичен, растворим в воде. Водный раствор прозрачный или слегка опалесцирующий.

Хранят в воздухонепроницаемом контейнере.

Цирконила нитрата раствор. *1097201.*

Раствор 1 г/л в смеси растворителей *вода Р- кислота хлористоводородная Р* (40:60).

Цирконила хлорид. Основная соль, состав которой приблизительно соответствует формуле $ZrCl_2O \cdot 8H_2O$. *1097100.* [15461-27-5].

Содержит не менее 96,0% $ZrCl_2O \cdot 8H_2O$.

Кристаллический порошок или кристаллы белого или почти белого цвета. Легко растворим в воде и 96% спирте.

Количественное определение. 0,600 г растворяют в смеси 5 мл *кислоты азотной Р* и 50 мл *воды Р*, прибавляют 50,0 мл *0,1 М раствора серебра нитрата,* 3 мл *раствора дибутилфталата Р,* взбалтывают титруют 0,1 *М раствором аммония тиоцианата до* красновато-жёлтого окрашивания, используя в качестве индикатора 2 мл *раствора железа (III) аммония сульфата Р2.*

1 мл *0,1 М раствора серебра нитрата* соответствует 16,11 мг $ZrCl_2O \cdot 8H_2O$.

L-Цистеин. $C_3H_7N0_2S$. *(М.м.* 121,1). *1024200* [52-90-4].

Порошок. Легко растворим в воде, 96% спирте и кислоте уксусной, практически нерастворим в ацетоне.

Цистеина гидрохлорид. $C_3H_8ClNO_2S \cdot H_2O$. *(М.м.* 175,6). *1024300* [7048-04-6].

(2R)-2-амино-3-сульфанилпропановой кислоты гидрохлорид. Цистеина гидрохлорид моногидрат.

Содержит не менее 98,5% и не более 101,0% $C_3H_8ClNO_2S$ в пересчете на сухое вещество.

Белый кристаллический порошок или бесцветные кристаллы. Легко растворим в воде, мало растворим в 96% спирте, практически нерастворим в эфире.

Потеря в массе при высушивании (2.2.32). От 8,0% до 12,0%. Определяют из навески 1,000 г высушивая под давлением не выше 0,7 кПа в течение 24 ч.

Хранят в защищенном от света месте.

L-Цистин. $C_6H_{12}N_20_4S_2$. (*М.м.* 240,3). *1024400. [*56-89-3].

Кристаллический порошок белого цвета. Практически нерастворим в воде и 96% спирте, растворяется в разведенных растворах гидроксидов щелочных металлов. Разлагается при температуре -250°С.

$[\alpha]_D^{20}$: от -218° до -224°. Определение проводят в *1 М растворе кислоты хлористоводородной.*

Цитраль. $C_{10}H_{16}O$. (*М.м.*152,2). *1020800.* [5392-40-5].

Смесь (2E)- и (2Z)-3,7-Диметилокта-2,6-диеналя.

Жидкость светло-жёлтого цвета. Практически нерастворима в воде, смешивается с 96% спиртом, эфиром и глицерином.

Хроматография. Определение проводят методом тонкослойной хроматографии *(2.2.27),* используя в качестве тонкого слоя *силикагель $GF_{!54}$ Р.* На хроматографическую пластинку наносят 10 мкл раствора 1 г/л в *толуоле Р.* Хроматографируют, используя систему растворителей *этилацетат Р — толуол Р* (15:85). Когда фронт растворителей дойдёт 15 см, пластинку вынимают из камеры и сушат на воздухе. Просматривают в УФ-свете при длине волны 254 нм. На полученной хроматограмме должно обнаруживаться только одно основное пятно.

Цитрированная плазма кролика. *1020900.*

У кролика, не принимавшего пищу в течение 12 ч, отбирают кровь внутрисердечной пункцией, используя пластиковый шприц с иглой №1, содержащий соответствующий объем раствора 38 г/л *натрия цитрата Р,* так, чтобы конечное соотношение объёмов раствора натрия цитрата и крови составляло 1:9. Отделяют плазму центрифугированием при ускорении от 1500 g до 1800 g и температуре от 15°С до 20°С в течение 30 мин.

Хранят при температуре от О°С до 6°С.

Срок годности 4 ч с момента отбора крови.

Цитроптен. $C_{11}H_{10}0_4$. (*М.м.* 206,2). *1021300.* [487-06-9].

Лиметтин. 5,7-Диметокси-2Н-1-бен-зопиран-2-он.

Игольчатые кристаллы. Практически нерастворим в воде, эфире и петролейном эфире, легко растворим в ацетоне и 96% спирте.

Температура плавления: около 145°С.

Хроматография. Определение проводят методом тонкослойной хроматографии *(2.2.27),* используя в качестве тонкого слоя *силикагель GF_{254} Р.* На хроматографическую пластинку наносят 10 мкл раствора 1 г/л в *толуоле Р.* Хроматографируют, используя систему растворителей *этилацетат Р - толуол Р* (15:85). Когда фронт растворителей пройдёт 15 см, пластинку вынимают из камеры и сушат на воздухе. Просматривают в УФ-свете при длине волны 254 нм. На полученной хроматограмме должно обнаруживаться только одно основное пятно.

Швейцера реактив. 10 г *меди сульфата Р* растворяют в 100 мл *воды Р*, прибавляют раствор 100 г/л *натрия гидроксида Р* в достаточном для осаждения гидрата окиси меди количестве, собирают последний на фильтре и промывают *водой Р* до исчезновения реакции на сульфаты. Влажный осадок растворяют в минимальном количестве *раствора аммиака разведенного Р1*, необходимом для полного растворения осадка. Хранят в стеклянном контейнере с притертой пробкой.

Щавелевая кислота. $C_2H_2O_4 \cdot 2H_2O$. *(М.м.* 126,1). *1061400.* [6153-56-6]. Этандикарбоновая кислота дигидрат.

Кристаллы белого цвета. Растворима в воде, легко растворима в 96% спирте.

Щавелевой кислоты и серной кислоты раствор. *1061401.*

Раствор 50 г/л *щавелевой кислоты Р* в охлажденной смеси равных объемов *кислоты серной Р* и *воды Р.*

Эвгенол. $C_{10}H_{12}O_2$. *(М.м.* 164,2). *1037000.* [97-53-0]. 4-Аллил-2-метоксифенол.

Бесцветная или бледно-желтого цвета маслянистая жидкость, под действием воздуха и света темнеет и становится более вязкой. Практически нерастворим в воде, смешивается с 96% спиртом, эфиром и жирными и эфирными маслами.

d_{20}^{20}: около 1,07.

Температура кипения: около 250°С.

Эвгенол, используемый в газовой хроматографии, должен выдерживать следующее дополнительное испытание.

Количественное определение. Проводят методом газовой хроматографии *(2.2.28),* как указано в статье *Масло гвоздичное,* используя эвгенол в качестве испытуемого раствора.

Площадь основного пика должна быть не менее 98,0% суммы площадей всех пиков.

Хранят в защищённом от света месте.

Эвкалиптол. См. *Цинеол.*

Эльманта реактив. См. *5,5'-Дитиобис(2-нитробензойная кислота).*

Эметина дигидрохлорид. $C_{29}H_{42}Cl_2N_2O_4{\cdot}5H_2O$. (*М.м.* 643,6). *1034300.* [316-42-7]. (2*S*, 3*R*, 11*bS*)-2-[[(1R)-6,7-диметокси-1,2,3,4-тетрагидраизохвиналин-1-ил]метил]-3-этил-9,10-диметокси-1,3,4,6,7,11*b*-гексагидра-2*H*-бензо[a]квинализина гидрохлорид. Эметина гидрохлорид пентагидрат.

Содержит не менее 98,0% и не более 102,0% $C_{29}H_{42}Cl_2N_2O_4$·в пересчете на сухое вещество.

Белый или слегка желтоватый кристаллический порошок. Легко растворим в воде и 96% спирте.

Потеря в массе при высушивании (2.2.32). От 11,0% до 15,0%. Определяют из навески 1,00 г высушиванием при температуре 100°С-105°С в течение 3 ч.

Хранят в защищенном от света месте.

Эмодин. $C_{15}H_{10}O_5$. (*М.м.* 270,2). *1034400.* [518-82-1].

1,3,8-Тригидрокси-6-метилантрахинон.

Игольчатые кристаллы оранжево-красного цвета. Практически нерастворим в воде, мало растворим в эфире, растворим в 96% спирте и растворах гидроксидов щелочных металлов.
Хроматография. Определение проводят, как указано в статье *Корни ревеня;* на хроматограмме должно обнаруживаться только одно основное пятно.

Эриохром черный. См. *Протравной черный 11.*

Эритритол. $C_4H_{10}O_4$. *(М.м.* 122,1). *1113800.* [149-32-6].

(R*,S*)-Бутан-1,2,3,4-тетрол. мезо-Эритритол.

Кристаллы в виде тетрагональных призм. Очень легко растворим в воде, растворим в пиридине, мало растворим в 96% спирте.

Температура плавления: около 121,5°С

Эрукамид. $C_{22}H_{43}NO$. *(М.м.* 337,6). *1034500.* [112-84-5]. (Z)-Докоз-13-еноамид.

Порошок желтоватого или белого цвета или гранулы. Практически нерастворим в воде, очень легко растворим в метиленхлориде, растворим в этаноле.

Температура плавления: около 70°С.

Эскулин. $C_{15}H_{16}O_9{\cdot}1.5H_2O$. *(М.м.* 367,3). *1119400.* [531-75-9].

6-(b -D-Глюкопиранозилокси)-7-гидрокси-2Н-хромен-2-он.

Порошок белого или почти белого цвета или бесцветные кристаллы. Умеренно растворим в воде и 96% спирте, легко растворим в горячей воде и горячем 96% спирте.

Хроматография (2.2.27). Определение проводят как указано в статье *Корни элеутерококка;* на хроматограмме должно обнаруживаться только одно основное пятно.

Эсграгол. $C_{10}H_{12}O$. *(М.м.* 148,2). *1034700.* [140-67-0].

1-Метокси-4-проп-2-енилбензол.

Жидкость. Смешивается с 96% спиртом.

n_{20}^{20}: около 1,52.

Температура кипения: около 216°С.

Эстрагол, используемый в газовой хроматографии, должен выдерживать следующее испытание.

Количественное определение. Проводят методом газовой хроматографии *(2.2.28)* в условиях, указанных в статье *Масло анисовое,* используя эстрагол в качестве испытуемого раствора.

Площадь основного пика должна быть не менее 98,0% суммы площадей всех пиков.

17α-Эстрадиол. $C_{18}H_{24}O_2$. *(М.м.* 272,4). *1034600.* [57-91-0].

Кристаллический порошок белого или почти белого цвета или бесцветные кристаллы.
Температура плавления: от 178°С до 179°*С.*

Эсцин. *1001700.* [11072-93-8].

Смесь родственнных сапонинов, полученных из семян *Aesculus hippocastanum L.*

Очень мелкий аморфный порошок почти белого или слегка красноватого или желтоватого цвета.

Хроматография. Определение проводят, как указано в статье *Корни сенеги,* но используют 20 мкл раствора. После опрыскивания хроматограммы *раствором анисового альдегида Р* и нагревания на хроматограмме испытуемого раствора должнй обнаруживаться основное пятно с R_f около 0,4.

Этанол. C_2H_6O. *(М.м.* 46.07). *1034800.* [64-17-5]. Этанол безводный.

Содержит не менее 99,5% (*об/об*) C_2H_6O (99,2% *м/м*) при 20°С рассчитанных из относительной плотности с использованием алкоголеметрических таблиц *(5.5).*

Бесцветная прозрачная, летучая, воспламеняющаяся, гигроскопичная жидкость. Смешивается с водой, метиленхлоридом. Горит синеватым слабо светящимся бездымным пламенем.

Температура кипения: около 78°С.

d_{20}^{20}: от 0,790 до 0,793.

Хранят в защищенном от света месте.

Этанол Р1. *1034801.*

Должен выдерживать требования для *этанола Р* и следующее дополнительное испытание.

Метанол. Не более 0.,05 *% (об/об).* Определение проводят методом газовой хроматографии *(2.2.28).*

Испытуемый раствор. Испытуемый этанол.

Раствор сравнения. 0,50 мл *метанола безводного Р* доводят испытуемым этанолом до объёма 100,0 мл. 1,0 мл полученного раствора доводят испытуемым этанолом до объёма 100,0 мл.

Хроматографирование проводят с использованием пламенно-ионизационного детектора в следующих условиях:

- — колонка стеклянная размером 2 м х 2 мм,заполненная *сополимером этилвинилбензол -дивинилбензола Р* с размером частиц от 75 мкм до 100 мкм;
- — газ-носитель *азот для хроматографии Р;*
- — скорость потока 30 мл/мин;
- — температура колонки 130°С;
- — температура инжектора при вводе проб 150°С;
- — температура детектора 200°С.

Вводят по 1 мкл испытуемого раствора и раствора сравнения, поочередно, три раза. После каждого хроматографирования нагревают колонку до температуры 230°С в течение 8 мин. Интегрируют пик метанола.

Содержание метанола *(X),* в процентах, вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot b}{c - b},$$

где:
a - содержание метанола в растворе сравнения, в процентах *(об/об);*
b - площадь пика метанола на хроматограмме испытуемого раствора;
c - площадь пика метанола на хроматограмме раствора сравнения.

Этаноламин. C_2H_7NO. *(М.м.* 61,1). *1034900.* [141-43-5]. 2-Аминоэтанол.

Прозрачная, бесцветная, вязкая, гигроскопичная кость. Смешивается с водой и метанолом, умеренно растворим в эфире.

d_{20}^{20}: около 1,04.

n_D^{20}: около 1,454.

Температура плавления: около 11°С.

Хранят в воздухонепроницаемом контейнере.

Этилакрилат. $C_5H_8O_2$. *(М.м.* 100,1). *1035400.* [140-88-5]. Этилпроп-2-еноат.

Бесцветная жидкость.

d_{20}^{20}: около 0,924.

n_D^{20}: около 1,406.

Температура кипения: около 99°С.

Температура плавления: около - 71°С.

Этилацетат. $C_4H_8O_2$. *(М.м.* 88,1). *1035300.* [141-78-6].

Прозрачная, бесцветная жидкость. Растворим в воде, смешивается с 96% спиртом.

d_{20}^{20}: от 0,901 до 0,904.

Температура кипения: от 76°С до 78°С.

Этилацетат обработанный. *1035301.*

200 г *кислоты сульфаминовой Р* диспергируют в *этилацетате Р* и доводят тем же растворителем до объёма 1000 мл. Полученную суспензию перемешивают в течение 3 сут и фильтруют через бумажный фильтр.

Срок годности 1 мес.

Этилбензол. C_8H_{10}. *(М.м.* 106,2). *1035800.* [100-41-4].

Содержит не менее 99,5*% (м/м)* C_8H_{10}, определение проводят методом газовой хроматографии.

Прозрачная, бесцветная жидкость. Практически нерастворим в воде, растворим в ацетоне и 96% спирте.

d_{20}^{20}: около 0,87.

n_D^{20}: около 1,496.

Температура кипения: около 135°С.

2-Этилгексан-1,3-диол. $C_8H_{18}O_2$. *(М.м.* 146,2). *1105900.* [94-96-2].

Слегка маслянистая жидкость. Растворим в этаноле, 2-пропаноле, пропиленгликоле и масле касторовом.

d_{20}^{20}: около 0,942.

n_D^{20}: около 1,451.

Температура кипения: около 244°С.

2-Этилгексановая кислота. $C_8H_{,6}O_2$. *(М.м.* 144.2). *1036600.* [149-57-5].

2-Этилкапроновая кислота.

Бесцветная жидкость.

d_{20}^{20}: около 0,91.

n_D^{20}: около 1,425.

Сопутствующие примеси. Определение проводят методом газовой хроматографии *(2.2.28).* Хроматографируют 1 мкл раствора, приготовленного следующим образом: 0,2 г кислоты 2-этилгексановой суспендируют в 5 мл *воды Р,* прибавляют 3 мл *кислоты хлористоводородной разведенной Р и* 5 *мл гексана Р,* встряхивают в течение 1 мин, после разделения слоев используют верхний слой. Хроматографируют в условиях, описанных для кислоты 2-этилгексановой в статье *Амоксициллина натриевая соль.*

Сумма площадей всех пиков, кроме основного и пика растворителя, не должна превышать 2,5% площади основного пика.

Этиленбис[3,3-ди(3-(1,1-диметилэтил)-4-гидроксифенил)бутират]. $C_{50}H_{66}O_8$. *(М.м.* 795). *1035900.* [32509-66-3].

Этиленбис[3,3-ди(3-*трет*-бутил-4-гидроксифенил)бутират].

Кристаллический порошок. Практически нерастворим в воде и петролейном эфире, очень легко растворим в ацетоне, эфире и метаноле.

Температура плавления: около 165°С.

Этиленбис[3,3-ди(3-*трет*-бутил-4-гидроксифенил)бутират]. *1035900.* [32509-66-3]. См. *Этиленбис[3,3-ди(3-(1,1-диметилэтил)-4-гидроксифенил)бутират].*

Этиленгликоль. $C_2H_60_2$. *(М.м.* 62,1). *1036100.* [107-21-1]. Этан-1,2-диол.

Бесцветная, слегка вязкая гигроскопичная жидкость. Смешивается с водой и 96% спиртом, мало растворим в эфире.

d_{20}^{20}: от 1,113 до 1,115.

n_D^{20}: около 1,432.

Температура плавления: около -12°С.

Температура кипения: около 198 °С.

Кислотность. К 10 мл прибавляют 20 мл *воды Р* и 1 мл *раствора фенолфталеина Р;* окраска раствора должна измениться до розовой при прибавлении не более 0,15 мл *0,02 М раствора натрия гидроксида.*

Вода (2.5.12). Не более 0,2%.

Этиленгликоля монометиловый эфир. $C_3H_8O_2$. *(М.м.* 76,1). *1036300.* [109-86-4].

2-Метоксиэтанол.

Прозрачная, бесцветная жидкость. Смешивается с водой, ацетоном, 96% спиртом и эфиром.

d_{20}^{20}: около 0,97.

n_D^{20}: около 1,403.

Температура кипения: около 125°С.

Этиленгликоля моноэтиловый эфир. $C_4H_{10}O_2$. *(М.м.* 90,1). *1036200.* [110-80-5].

2-Этоксиэтанол.

Прозрачная, бесцветная жидкость. Смешивается с водой, ацетоном, 96% спиртом и эфиром.

d_{20}^{20}: около 0,93.

n_D^{20}: около 1,406.

Температура кипения: около 135°С.

Этилендиамин. $C_2H_8N_2$. *(М.м.* 60.,). *1036500.* [107-15-3]. Этан-1,2-диамин.

Прозрачная, бесцветная, дымящаяся жидкость; имеет сильнощелочную реакцию. Смешивается с водой и 96% спиртом, мало растворим в эфире.

Температура кипения: около 116°С.

(Этилендинитрил)тетрауксусная кислота. $C_{10}H_{16}N_2O_8$. *(М.м.* 292,2). *1105800.* [60-00-4]. N,N-1,2-этандиилбис[N'-(карбоксиметил)глицин]. Эдетовая кислота.

Кристаллический порошок белого цвета. Очень мало растворима в воде.

Температура плавления: около 250°С с разложением.

Этиленоксид. C_2H_4O. *(М.м.* 44,05). *1036400* [75-21-8]. Оксиран.

Бесцветный, воспламеняющийся газ. Очень легко растворим в воде и этаноле.

Температура ожижения: около 12°С.

Этиленоксида исходный раствор. *1036401.*

Все операции, производимые в ходе приготовления растворов, выполняют в вытяжном шкафу. Защищают руки и лицо, надевая полиэтиленовые защитные перчатки и подходящую маску для лица.

Растворы хранят в воздухонепроницаемом контейнере, в холодильнике при температуре от *4°С до 8°С. Все испытания проводят три раза.*

В сухую чистую тест-пробирку, охлаждённую в смеси из 1 части *натрия хлорида Р* и 3 частей измельчённого льда, медленно вводят поток газообразного *этиленоксида Р,* позволяя конденсироваться на внутренней стенке тест-пробирки. С помощью стеклянного шприца, предварительно охлажденного до температуры 10°С, помещают около 300 мкл (что соответствует приблизительно 0,25 г этиленоксида) жидкого *этиленоксида Р* в 50 мл *макрогола 200 Р1.* Определяют абсорбированное количество этиленоксида взвешиванием до и после абсорбции (M_{eo}). Разводят *макроголом 200 Р1* до объёма 100,0 мл. Перед использованием тщательно перемешивают.

Количественное определение. К 10 мл суспензии 500 г/л *магния хлорида Р в этаноле Р* прибавляют 20,0 мл *0,1 М раствора кислоты*; хло*ристоводородной в спирте.* Колбу закрывают пробкой, взбалтывают до получения насыщенного раствора и для достижения равновесия выдерживают в течение ночи. 5,00 г исходного раствора 2,5 г/л *этиленоксида Р* помещают в колбу, взвешивают, выдерживают в течение 30 мин и титруют *0,1 М раствором калия гидроксида спиртовым* потенциометрически *(2.2.20).*

Проводят контрольный опыт, используя вместо исходного раствора этиленоксида такое же количество *макрогола 200 Р1.*

Содержание этиленоксида *(X),* в миллиграммах в одном грамме, вычисляют по формуле:

$$X = \frac{(V_0 - V_1) \cdot f \cdot 4{,}404}{m}$$

где:
V_0 и V_1— объём *0,1 М раствора калия гидроксида спиртового,* израсходованный на титрование контрольного и испытуемого раствора, соответственно;
f — поправочный коэффициент к молярности *0,1 М раствора калия гидроксида спиртового;*
m - масса испытуемого образца, в граммах.

Этиленоксида раствор. *1036402.*

Взвешивают количество охлаждённого *исходного раствора этиленоксида Р,* соответствующее 2,5 мг этиленоксида, в охлаждённой колбе и доводят *макроголом 200 Р1* до 50,0 г, тщательно перемешивают. 2,5 г полученного раствора доводят *макроголом 200 Р1* до объёма 25,0 мл (5 мкг этиленоксида в I г раствора).

Готовят непосредственно перед использованием.

Этиленоксида раствор Р1. *1036403.*

1,0 мл (точная навеска) охлаждённого *исходного раствора этиленоксида Р,* доводят *макроголом 200 Р1* до объёма 50,0 мл и тщательно перемешивают. 2,5 г полученного раствора доводят *макроголом 200 Р1* до объёма 25,0 мл. Содержание этиленоксида, в ppm, вычисляют из объема, определенного взвешиванием, принимая плотность *макрогола 200 Р1* равной 1,127.

Готовят непосредственно перед использованием.

Этиленоксида раствор Р2. *1036404.*

1,00 г охлажденного *исходного раствора этиленоксида Р,* (что соответствует 2,5 мг этиленоксида), помещают в предварительно взвешенную колбу, содержащую 40,0 г охлажденного *макрогола 200 Р1* и перемешивают. Определяют точную массу и разводят до расчётной массы таким образом, чтобы получить раствор, содержащий 50 мкг этиленоксида в 1 г раствора. Взвешивают 10,00 г, помещают в колбу, содержащую около 30 мл *воды Р,* перемешивают и доводят *водой Р* до объёма 50,0 мл (10 мкг/мл этиленоксида).

Готовят непосредственно перед использованием.

Этиленоксида раствор Р3. *1036405.*

10,0 мл *раствора этиленоксида Р2* доводят *водой Р до* объёма 50,0 мл (2 мкг/мл этиленоксида).
Готовят непосредственно перед использованием.

Этиленхлорид. $C_2H_4Cl_2$. *(М.м.* 99,0). *1036000.* [107-06-2]. 1,2-Дихлорэтан.

Прозрачная, бесцветная жидкость. Растворим приблизительно в 120 частях воды и 2 частях 96% спирта, смешивается с эфиром.

d_{20}^{20}: около 1,25.

Температурные пределы перегонки (2.2.11). От 82°С до 84°С; должно перегоняться не менее 95%.

1,1'-Этилиденбис(триптофан). $C_{24}H_{26}N_4O_4$. *(М.м.* 434,5). *1106000.* [132685-02-0]. 3,3'-[Этилиденбис(1Н-индол-1,3-диил)]бис[(2S)-2-аминопропионовая кислота].

Содержит не менее 98,0% $C_{24}H_{26}N_4O_4$.

Кристаллический порошок белого или почти белого цвета. Мало растворим в воде, очень мало растворим в 96% спирте, практически не растворим в эфире.

Температура плавления: около 223°С с разложением.

Количественное определение. Проводят, как указано в статье *Триптофан* в разделе «1, 1'- Этилиденбис(триптофан) и другие сопутствующие примеси».

Площадь основного пика на хроматограмме раствора сравнения (а) должна быть не менее 98,0% суммы площадей всех пиков.

N-Этилмалеимид. $C_6H_7NO_2$. *(М.м.* 125,1). *1036700.* [128-53-0].

1-Этил-1Н-пиррол-2,5-дион.

Бесцветные кристаллы. Умеренно растворим в воде, легко растворим в 96% спирте.

Температура плавления: от 41°С до 45°С.

Хранят при температуре от 2°С до 8°С.

Этилметилкетон. *1054100.* [78-93-3]. См. *Метилэтилкетон.*

2-Этил-2-метилянтарная кислота. $C_7H_{12}0_4$. *(М.м.* 160,2). *1036800.* [631-31-2].

2-Этил-2-метилбутандикарбоновая кислота.

Температура плавления: от 104°С до 107°С.

Этилпарагидроксибензоат. $C_9H_{10}O_3$. *(М.м.* 166,2). *1035700.* [120-47-8].

Этил 4-гидроксибензоат.

Содержит не менее 99,0% и не более 100,5% $C_9H_{10}O_3$.

Белый или почти белый кристаллический порошок или бесцветные кристаллы. Очень мало растворим в воде, легко растворим в 96% спирте и метаноле.

Температура плавления (2.2.14): от 115°С до 118°С.

Этилформиат. $C_3H_6O_2$. *(М.м.* 74,1). *1035600.* [109-94-4]. Этилметаноат.

Прозрачная, бесцветная воспламеняющаяся жидкость. Легко растворим в воде, смешивается с 96% спиртом и эфиром.

d_{20}^{20}: около 0,919.

n_D^{20}: около 1,36.

Температура кипения: около 54°С.

Этилцианоацетат. $C_5H_7NO_2$. *(М.м.* 113,1). *1035500.* [105-56-6].

Бесцветная или светло-жёлтого цвета жидкость. Мало растворим в воде, смешивается с 96% спиртом и эфиром.

Температура кипения: от 205°С до 209°С с разложением.

Этоксихризоидина гидрохлорид. $C_{14}H_{17}ClN_4O$. *(М.м.* 292,8). *1035200.* [2313-87-3]. 4-[(4-Этоксифенил)диазенил]фенилен-1,3-диамина гидрохлорид.

Порошок красноватого цвета. Растворим в 96% спирте.

Этоксихризоидина раствор. *1035201.*

Раствор 1 г/л в *96% спирте Р.*

Испытание на чувствительность. К смеси 5 мл *кислоты хлористоводородной разведенной Р* и 0,05 мл раствора этоксихризоидина прибавляют 0,05 мл *0,0167 М раствора бромид-бромата.* Окраска раствора должна измениться от красной до светло-жёлтой в течение 2 мин.

Эуглобулины бычьи. *1037100.*

Используют свежую бычью кровь, собранную в раствор антикоагулянта (например, раствор натрия цитрата). Отбрасывают любую гемолизированную кровь. Центрифугируют с ускорением от 1500 g до 1800 g при температуре от 15°С до 20°С для получения супернатанта плазмы с низким содержанием тромбоцитов.

К 1 л плазмы бычьей прибавляют 75 г *бария сульфата Р,* встряхивают в течение 30 мин, затем центрифугируют с ускорением от 1500 g до 1800 g при температуре от 15°С до 20°С и отделяют прозрачную надосадочную жидкость. Прибавляют 10 мл раствора 0,2 мг/мл *апротинина Р* и встряхивают до смешения. В контейнер с минимальной вместимостью 30 л в камере с температурой 4°С помещают 25 л *воды дистиллированной Р,* охлаждённой до температуры 4°С, прибавляют около 500 г твердого углерода диоксида и тотчас, при перемешивании, прибавляют надосадочную жидкость, полученную из плазмы. Образуется белый осадок. Для осаждения выдерживают при температуре 4°С от 10 ч до 15 ч. Прозрачную надосадочную жидкость отделяют с помощью сифона. Собирают осадок центрифугированием при температуре 4°С. Суспендируют осадок механическим диспергированием в 500 мл *воды дистиллированной Р* при температуре 4°С, взбалтывают в течение 5 мин и отделяют осадок центрифугированием при температуре 4°С. Осадок механически диспергируют в 60 мл раствора, содержащего 9 г/л *натрия хлорида Р и* 0,9 г/л *натрия цитрата Р,* доводят pH до 7,2-7,4 раствором 10 г/л *натрия гидроксида Р* и фильтруют через стеклянный фильтр. Полученный осадок измельчают в ступке, фильтр и ступку промывают 40 мл раствора, содержащего 9 г/л *натрия хлорида Р* и 0,9 г/л *натрия цитрата Р,* доводят тем же раствором до объёма 100 мл и лиофилизируют. Обычно выход составляет от 6 г до 8 г эуглобулинов из 1 л плазмы бычьей.

Испытание на пригодность. Готовят раствор, используя *фосфатный буферный раствор pH 7,4 Р,* содержащий 30 г/л *альбумина бычьего Р.*

В тест-пробирку диаметром 8 мм, помещенную в водяную баню при температуре 37°С, вносят 0,2 мл раствора сравнения урокиназы, содержащего 100 МЕ/мл, и 0,1 мл раствора *тромбина человеческого Р,* содержащего 20 МЕ/мл. Быстро вводят 0,5 мл раствора, содержащего 10 мг эуглобулинов бычьих в миллилитре. Должен образоваться плотный сгусток за время менее 10 с. Отмечают время, прошедшее между прибавлением раствора эуглобулинов бычьих и разрушением сгустка. Время лизиса не должно превышать 15 мин.

Хранят в сухом месте при температуре 4°С. Срок годности 1 год.

Эуглобулины человеческие. *1037200.*

Для приготовления используют свежую человеческую кровь, собранную в раствор антикоагулянта (например, раствор натрия цитрата) или человеческую кровь для переливания, собранную в пластмассовые контейнеры для крови, с только что истекшим сроком хранения. Отбрасывают любую гемолизированную кровь. Центрифугируют с ускорением от 1500g до 1800g при температуре 15°С для получения супернатанта плазмы с низким содержанием тромбоцитов.

Можно смешивать плазмы, полученные из крови одной группы.

К 1 л плазмы прибавляют 75 г *бария сульфата Р,взбалтыва*ют в течение 30 мин, затем центрифугируют при температуре 15°С с ускорением не 1500 g и отделяют прозрачную надосадочную жидкость. Прибавляют 10 мл раствора 0,2 мг/мл *апротинина Р* и встряхивают до смешения. В контейнер с минимальной вместимостью 30 л в камере с температурой 4°С помещают 25 л *воды дистиллированной Р,* охлаждённой до темперары 4°С, прибавляют около 500 г твердого углерода диоксида и тотчас прибавляют, при перемешивании, надосадочную жидкость, полученную из плазмы; образуется белый осадок. Оставляют для осаждения при температуре 4°С на 10— 15 ч. Удаляют прозрачную надосадочную жидкость с помощью сифонирования. Собирают осадок центрифугированием при температуре 4°С. Суспендируют осадок механическим диспергированием в 500 мл *воды дистиллированной Р* при температуре 4°С, взбалтывают в течение 5 минут и отделяют осадок центрифугированием при температуре 4°С. Механически диспергируют осадок в 60 мл раствора, содержащего 9 г/л *натрия хлорида Р* и 0,9 г/л *натрия цитрата Р,* и доводят pH до 7,2-7,4 раствором *натрия гидроксида Р*. Фильтруют через стеклянный фильтр. Полученный осадок измельчают с помощью подходящего инструмента. Промывают фильтр и инструмент 40 мл раствора, содержащего 9 г/л *натрия хлорида Р и* 0,9 г/л *натрия цитрата Р,* и разводят до объёма 100 мл тем же раствором. Лиофилизируют. Обычно выход составляет от 6 г до 8 г эуглобулинов из 1 л плазмы человеческой.

Испытание на пригодность. Для этого испытания готовят раствор, используя *фосфатный буферный раствор pH 7,2 Р,* содержащий 30 г/л *альбумина бычьего Р.* В тест-пробирку диаметром 8 мм, помещённую в водяную баню при температуре 37°С, вносят 0,1 мл раствора сравнения стрептокиназы, содержащего 10 МЕ/мл стрептокиназной активности, и 0,1 мл раствора *тромбина человеческого Р,* содержащего 20 МЕ/мл. Быстро прибавляют 1 мл раствора, содержащего 10 мг/мл эуглобулинов человеческих. Должен образоваться плотный сгусток за время менее 10 с. Отмечают время, прошедшее между прибавлением раствора эуглобулинов человеческих и разрушением сгустка. Время лизиса не должно превышать 15 мин.

Хранят в воздухонепроницаемом контейнере при температуре 4°С.

Срок годности 1 год.

Эфир. $C_4H_{10}O$. (*М.м.* 74,1). *1035000.* [60-29-7].

Прозрачная, бесцветная, летучая, очень подвижная, легко воспламеняющаяся жидкость. Гигроскопичен, растворим в воде, смешивается с 96% спиртом.

d_{20}^{20}: от 0,713 до 0,715.

Температура кипения: от 34°С до 35°С.

Не перегоняют, если эфир не выдерживает испытания на пероксиды.

Пероксиды. 8 мл *раствора крахмала с калия йодидом Р* помещают в цилиндр с притёртой стеклянной пробкой, вместимостью 12 мл и диаметром около 15 мм. Объём цилиндра заполняют полностью испытуемым эфиром, энергично встряхивают и выдерживают в тёмном месте в течение 30 мин; не должно появиться окрашивание.

Название и концентрация любого добавленного стабилизатора должны быть указаны на этикетке.

Хранят в воздухонепроницаемом контейнере, защищённом от света месте, при температуре не выше 15°C.

Эфир, свободный от пероксидов. $C_4H_{10}O$. (*М.м.* 74,1). *1035100.* Диэтиловый эфир.Эфир для наркоза.

Прозрачная, бесцветная, летучая, очень подвижная, легко воспламеняющаяся жидкость. Растворим в 15 ч воды, смешивается с 96% спиртом и жирными маслами.

d_{20}^{20}: от 0,714 до 0,716.

Температурные пределы перегонки: от 34°C до 35°C.

Не перегоняют, если эфир не выдерживает испытания на пероксиды.

Пероксиды. 8 мл *раствора крахмала с калия йодидом Р* помещают в цилиндр с притёртой стеклянной пробкой, вместимостью 12 мл и диаметром около 15 мм. Объём цилиндра заполняют полностью испытуемым эфиром, энергично встряхивают и выдерживают в тёмном месте в течение 30 мин; не должно появиться окрашивание.

Название и концентрация любого добавленного стабилизатора должны быть указаны на этикетке.

Хранят в воздухонепроницаемом контейнере, защищённом от света месте, при температуре от 8°C до 15°C.

Янтарная кислота. $C_4H_6O_4$. *(М.м.* 118,1). *1085600.* [110-15-6]. Бутандикарбоновая кислота.

Кристаллический порошок или бесцветные кристаллы белого цвета. Растворима в воде и 96% спирте.

Температура плавления: от 184°C до 187°C.

4.1.2. ЭТАЛОННЫЕ РАСТВОРЫ ДЛЯ ИСПЫТАНИЙ НА ПРЕДЕЛЬНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ПРИМЕСЕЙ

Алюминия эталонный раствор (200 ppm Al). *5000200.*

Навеску *алюминия-калия сульфата Р,* соответствующую 0,352 г $AlK(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$, растворяют *в воде Р,* прибавляют 10 мл *кислоты серной разведенной Р* и доводят объём раствора *водой* Р до 100,0 мл.

Алюминия эталонный раствор (100 ppm Al). *5000203.*

8,947 г *алюминия хлорида Р* растворяют в *воде Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 1000,0 мл.

Раствор разводят *водой Р в* 10 раз непосредственно перед использованием.

Алюминия эталонный раствор (10 ppm Al). *5000201.*

Навеску *алюминия нитрата Р,* соответствующую 1,39 г $Al(N0_3)_3 \cdot 9H_2O$, растворяют в *воде Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл.

Раствор разводят *водой Р* в 100 раз непосредственно перед использованием.

Алюминия эталонный раствор (2 ppm Al). 50000202.
Навеску *алюминия-калия сульфата Р,* соответствующую 0,352 г $AlK(SO_4) \cdot 12H_2O$, растворяют в 10 *мл кислоты серной разведенной Р* и доводят объём раствора *водой Р* до 100,0 мл.

Раствор разводят *водой Р* в 100 раз непосредственно перед использованием.

Аммония эталонный раствор (100 ppm NH_4). *5000300.*

Навеску *аммония хлорида Р,* соответствующую 0,741 г NH_4Cl, растворяют в *воде Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 1000,0 мл.

10 мл полученного раствора доводят *водой Р* до объёма 25 мл непосредственно перед использованием.

Аммония эталонный раствор (2,5 ppm NH_4). *5000301.*

Навеску *аммония хлорида Р,* соответствующую 0,741 г NH_4Cl, растворяют в *воде Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 1000,0 мл.

Раствор разводят *водой Р* в 100 раз непосредственно перед использованием.

Аммония эталонный раствор (1 ppm NH_4). *5000302.*

Эталонный раствор аммония (2,5 ppm NH_4) Р разводят *водой Р* в 2,5 раза непосредственно перед использованием.

Ацетальдегида эталонный раствор (100 ppm C_2H_4O). *5000100.*

1,0 г *ацетальдегида Р* растворяют в *2-пропаноле Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл. 5,0 мл полученного раствора доводят *2-пропанолом Р* до объёма 500,0 мл.

Готовят непосредственно перед использованием.

Ацетальдегида эталонный раствор (100 ppm C_2H_4O) Р1. *5000101.*

1,0 г *ацетальдегида Р* растворяют в *воде Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл. 5,0 мл полученного раствора доводят *водой Р* до объёма 500,0 мл.

Готовят непосредственно перед использованием

Бария эталонный раствор (50 ppm Ba). *5000600.*

Навеску *бария хлорида Р,* соответствующую 0,178 г $BaCl_2 \cdot 2H_2O$ растворяют в *воде дистиллированной Р* и довод объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл.

Раствор разводят в 20 раз *водой дистиллированной Р* непосредственно перед использованием.

Ванадия эталонный раствор (1 г/л V). *5003300.*
Навеску *аммония ванадата Р,* соответствующую 0,230 г NH_4VO_3, растворяют в *воде Р* и доводят тем растворителем до объёма 100,0 мл.

Глиоксаля эталонный раствор (20 ppm $C_2H_2O_2$). *5003700.*

В мерной колбе вместимостью 100 мл взвешивают количество *раствора глиоксаля Р,* соответствующее 0,200 г $C_2H_2O_2$, и доводят объём раствора *этанолом Р* до метки.

Раствор разводят *этанолом Р* в 100 раз непосредственно перед использованием.

Железа эталонный раствор (0,1% Fe). *5001605.*

0,100 г Fe растворяют в минимально необходимом количестве смеси равных объёмов *кислоты, хлористоводородной Р и воды Р*, доводят объём раствора *водой Р* до 100,0 мл.

Железа эталонный раствор (250 ppm Fe). *5001606.*

Навеску *железа (III) хлорида Р,* соответствующую 4,840 г $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ растворяют в растворе 150 г/л *кислоты хлористоводородной Р* и доводят объём раствора той же кислотой до 100,0 мл.

Раствор разводят *водой Р* в 40 раз непосредственно перед использованием.

Железа эталонный раствор (20 ppm Fe). *5001600.*

Навеску *железа (III) аммония сульфата Р,* соответствующую 0,863 г $FeNH_4(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$, растворяют в 25 мл *кислоты серной разведенной Р* и доводят объём раствора *водом Р* до 500,0 мл.

Раствор разводят *водой* Р в 10 раз непосредственно перед использованием.

Железа эталонный раствор (10 ppm Fe). *5001601.*

Навеску *железа (II) аммония сульфата Р*, соответствующую 7,022 г $Fe(NH_4)_2(S0_4)_2 \cdot 6H_20$, растворяют в 25 мл *кислоты серной разведенной Р* и доводят объём раствора *водой Р* до 1000.0 мл.

Раствор разводят *водой* Р в 100 раз непосредственно перед использованием.

Железа эталонный раствор (8 ppm Fe). *5001602.*

80 *мг железа Р* растворяют в 50 мл раствора 220 г/л (HCl) *кислоты хлористоводородной Р* и доводят объём раствора водой Р до 1000,0 мл.

Раствор разводят *водой Р* в 10 раз непосредственно перед использованием.

Железа эталонный раствор (2 ppm Fe). *5001603.*

Эталонный раствор железа (20ppm Fe) Р разводят *водой Р* в 10 раз непосредственно перед использованием.

Железа эталонный раствор (1 ppm Fe). *5001604.*

Эталонный раствор железа (20ppm Fe) Р разводят до *водой Р в 20* раз.

Йодида эталонный раствор (10 ppm I). *5003800.*
Навеску *калия йодида Р,* соответствующую 0,131 г KI, растворяют в *воде Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл.

Раствор разводят *водой Р* в 100 раз непосредственно перед использованием.

Кадмия эталонный раствор (0,1% Cd). *5000700.*

Навеску *кадмия Р,* соответствующую 0,100 г Cd, растворяют в минимально необходимом количестве смеси равных объёмов *кислоты хлористоводородной Р и воды Р;* доводят объём раствора 1*% (об/об)* раствором *кислоты хлористоводородной Р до* 100,0 мл.

Кадмия эталонный раствор (10 ppm). *5000701.*

Эталонный раствор кадмия (0,1% Cd) Р разводят 1% (об/об) раствором *кислоты хлористоводородной Р в* 100 раз непосредственно перед использованием.

Калия эталонный раствор (100 ppm K). *5002400.*

Навеску *калия сульфата Р,* соответствующую 0,446 г K_2SO_4, растворяют в *воде Р* и доводят объем раствора тем жё растворителем до 100,0 мл.

Раствор разводят *водой Р* в 20 раз непосредственно перед использованием.

Калия эталонный раствор (20 ppm K). *5002401.*

Эталонный раствор калия (100 ppm K) Р разводят *водой Р в* 5 раз непосредственно перед использованием.

Кальция эталонный раствор (400 ppm Ca). *5000800.*

Навеску *кальция карбоната Р,* соответствующую 1,000 г $CaCO_3$, растворяют в 23 мл *1 М раствора кислоты хлористоводородной* и доводят объём раствора *водой дистиллированной Р* до 100,0 мл.

Раствор разводят *водой дистиллированной Р* в 10 раз непосредственно перед использованием.

Кальция эталонный раствор (100 ppm Ca). *5000801.*

Навеску *кальция карбоната Р,* соответствующую 0,624 г $CaCO_3$, растворяют в 3 мл *кислоты уксусной Р* и доводят объём раствора *водой дистиллированной Р* до 250,0 мл.

Раствор разводят *водой дистиллированной Р* в 10 раз непосредственно перед использованием.

Кальция эталонный раствор (100 ppm Ca) PI. *5000804.*

Навеску *кальция хлорида безводного Р,* соответствующую 2,769 г $CaCl_2$, растворяют в *кислоте хлористоводородной разведенной Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 1000,0 мл.

Раствор разводят *водой Р в* 10 раз непосредственно перед использованием.

Кальция эталонный раствор спиртовой (100 ppm Ca). 5000802

Навеску *кальция карбоната Р,* соответствующую 2,50 г $CaCO_3$, растворяют в 12 *мл кислоты уксусной Р* и доводят объём раствора *водой дистиллированной Р* до 1000,0мл.

Раствор разводят *96% спиртом Р* в 10 раз непосредственно перед использованием.

Кальция эталонный раствор (10 ppm Ca). *5000803.*

Навеску *кальция карбоната Р,* соответствующую 0,624 г $CaCO_3$, растворяют в 3 мл *кислоты уксусной Р* и доводят объём раствора *водой дистиллированной Р* до 250,0 мл.

Раствор разводят *водой дистиллированной Р* в 100 раз непосредственно перед использованием.

Магния эталонный раствор (100 ppm Mg). *5001800.*

Навеску *магния сульфата Р,* соответствующую 1,010 г $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, растворяют в *воде Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл.

Раствор разводят водой *Р* в 10 раз непосредственно перед использованием.

Магния эталонный раствор (10 ppm Mg). *5001801.*

Эталонный раствор магния (100 ppm Mg) Р разводят *водой Р* в 10 раз непосредственно перед использованием.

Магния эталонный раствор (10 ppm Mg) PI. *5001802*
Навеску 8,365 г *магния хлорида Р* растворяют в *кислоте хлористоводородной разведенной Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 1000,0 мл.

Раствор разводят *водой* Р в 100 раз непосредственно перед использованием.

Меди эталонный раствор (0,1% Cu). ***5001100.***

Навеску *меди (II) сульфата Р*, соответствующую 0,393 г $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, растворяют в *воде Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл.

Меди эталонный раствор (10 ppm Cu). *5001101*

Эталонный раствор меди (0.1% Cu) Р разводят *водой Р* в 100 раз непосредственно перед использованием.

Меди эталонный раствор (0,1 ppm Cu). *5001102.*

Эталонный раствор меди (10 ppm Cu) Р разводят *водой Р* в 100 раз непосредственно перед использованием.

Мышьяка эталонный раствор (10 ppm As). 5000500.
Навеску *мышьяка (III) оксида Р,* соответствующую 0,330 г As_2O_3, растворяют в 5 мл *раствора натрия гидроксида разведенного Р* и доводят объём раствора *водой Р* до 250,0 мл.

Раствор разводят *водой Р* в 100 раз непосредственно перед использованием.

Мышьяка эталонный раствор (1 ppm As). *5000501.*

Эталонный раствор мышьяка (10 ppm As) Р разводят *водой Р* в 10 раз непосредственно перед использованием.

Мышьяка эталонный раствор (0.1 ppm As). *5000502.*

Эталонный раствор мышьяка (1 ppm As) Р разводят *водой Р* в 10 раз непосредственно перед использованием.

Натрия эталонный раствор (200 ppm Na). *5002700.*

Навеску *натрия хлорида Р,* соответствующую 0,509 г NaCl, растворяют в *воде Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл.

Раствор разводят *водой Р* в 10 раз непосредственно перед использованием.

Натрия эталонный раствор (50 ppm Na). *5002701.*

Эталонный раствор натрия (200 ppm Na) разводят *водой Р* в 4 раза.

Никеля эталонный раствор (10 ppm Ni). *5002000,*

Навеску *никеля сульфата Р,* соответствующую 4,78 г $NiSO_4 \cdot 7H_2O$, растворяют в *воде Р и* доводят объём раствора тем же растворителем до 1000,0 мл.

Раствор разводят *водой Р* в 100 раз непосредственно перед использованием.

Никеля эталонный раствор (0,2 ppm Ni). *5002002.*

Эталонный раствор никеля (10 ppm Ni) Р разводят *водой Р* в 50 раз непосредственно перед использованием.

Никеля эталонный раствор (0,1 ppm Ni). 5002001.
Эталонный раствор никеля (10 ppm Ni) Р разводят *водой Р* в 100 раз непосредственно перед использованием.

Нитрата эталонный раствор (100 ppm NO_3). *5002100.*

Навеску *калия нитрата Р,* соответствующую 0,815 г KNO_3, растворяют в *воде Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 500,0 мл.

Раствор разводят водой р в 10 раз непосредственно перед использованием.

Нитрата эталонный раствор (10 ppm NO_3). *5002101.*

Эталонный раствор нитрата (100 ppm NO_3) Р разводят *водой* Р в 10 раз непосредственно перед использованием.

Нитрата эталонный раствор (2 ppm NO_3). *5002102.*

Эталонный раствор нитрата (10 ppm NO_3) Р разводят *водой Р* в 5 раз непосредственно перед использованием.

Олова эталонный раствор (5 ppm Sn). *5003100.*

Навеску *олова Р,* соответствующую 0,500 г Sn, растворяют в смеси 5 мл *воды Р* и 25 мл *кислоты хлористоводородной Р*, доводят объём раствора *водой Р* до 1000,0 мл.

Раствор разводят 2,5*% (об/об)* раствором *кислоты хлористоводородной* Р в 100 раз непосредственно перед использованием.

Олова эталонный раствор (0,1 ppm Sn). *5003101.*

Эталонный раствор олова (5 ppm Sn) Р разводят *водой Р* в 50 раз непосредственно перед использованием.

Палладия эталонный раствор (500 ppm Pd). *5003600.*

50,0 мг *палладия Р* растворяют в 9 *мл кислоты хлористоводородной Р* и доводят объём раствора *водой Р до* 100,0мл.

Палладия эталонный раствор (20 ppm Pd). 5003602.

0,333 мг *палладия хлорида Р* растворяют в 2 мл тёплой *кислоты хлористоводородной Р* и доводят объём раствора смесью равных объёмов *кислоты хлористоводородной разведённой Р* и *воды Р* до 1000,0 мл.

Раствор разводят водой Р в 10 раз непосредственно перед использованием.

Палладия эталонный раствор (0,5 ppm Pd). 5003601.

Эталонный раствор палладия (500 ppm Pd) Р разводят смесью 0,3 объёма *кислоты азотной Р* и 99,7 объёма *воды Р*.

Платины эталонный раствор (30 ppm Pt). 5002300.

80 мг *кислоты хлорплатиновой Р* растворяют в *1 М растворе кислоты хлористоводородной* и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл

Раствор разводят *1 М раствором кислоты хлористоводородной* в 10 раз непосредственно перед использованием.

Ртути эталонный раствор (1000 ppm Hg). 5001900.

Навеску *ртути (II) хлорида Р*, соответствующую 1,354 г $HgCl_2$, растворяют в 50 мл *кислоты азотной разведённой Р* и доводят объём раствора *водой Р* до 1000,0 мл.

Свинца эталонный раствор (0,1% Pb). 5001700.

Навеску *свинца (II) нитрата Р*, соответствующую 0,400 г $Pb(No_3)_2$, растворяют в воде Р и доводят тем же растворителем до объёма 250,0 мл.

Свинца эталонный раствор (100 ppm Pb). 5001701.
Эталонный раствор свинца (0,1% Pb) Р разводят *водой Р* в 10 раз непосредственно перед использованием.

Свинца эталонный раствор (10 ppm Pb). 5001702.
Эталонный раствор свинца (100 ppm Pb) Р разводят *водой Р* в 10 раз непосредственно перед использованием.

Свинца эталонный раствор (10 ppm Pb) Р1. 5001706.
0,160 г *свинца (II) нитрата Р* растворяют в 100 мл *воды Р*, прибавляют 1 мл *кислоты азотной, свободной от свинца, Р* и доводят объём раствора *водой Р* до 1000,0 мл
Раствор разводят водой Р в 10 раз непосредственно перед использованием.

Свинца эталонный раствор (2 ppm Pb). 5001703.
Эталонный раствор свинца (10 ppm Pb) Р разводят *водой Р* в 5 раз непосредственно перед использованием.

Свинца эталонный раствор (1 ppm Pb). 5001704.
Эталонный раствор свинца (10 ppm Pb) Р разводят *водой Р* в 10 раз непосредственно перед использованием.

Свинца эталонный раствор (0,1 ppm Pb). 5001705.
Эталонный раствор свинца (1 ppm Pb) Р разводят *водой Р* в 10 раз непосредственно перед использованием.

Селена эталонный раствор (100 ppm Se). 5002500.
0,100 г *селена Р* растворяют в 2 мл *кислоты азотной Р*, выпаривают досуха. Остаток растворяют в 2 мл *воды Р* и выпаривают досуха; эту операцию повторяют три раза. Остаток растворяют в 50 мл *кислоты хлористоводородной разведённой Р* и доводят объём раствора той же кислотой до 1000,0 мл

Селена эталонный раствор (1 ppm Se). 5002501.
Навеску *кислоты селенистой Р*, соответствующую 6,54 г H_2SeO_3, растворяют в *воде Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл.
Раствор разводят водой Р в 40 раз непосредственно перед использованием.

Серебра эталонный раствор (5 ppm Ag). 5002600.
Навеску *серебра нитрата Р*, соответствующую 0,790 г $AgNO_3$, растворяют в *воде Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 1000,0 мл.
Раствор разводят *водой Р* в 100 раз непосредственно перед использованием.

Стронция эталонный раствор (1,0% Sr). 5003900.
Навеску *стронция карбоната Р*, соответствующую 1,6849 г $SrCO_3$, покрывают *водой Р*; прибавляют *кислоту хлористоводородную Р* до растворения и прекращения выделения пузырьков газа, фильтруют и разводят *водой Р* до объёма 100,0 мл.

Сульфата эталонный раствор (100 ppm SO_4). 5002802.
Навеску *калия сульфата Р*, соответствующую 0,181 г K_2SO_4, растворяют в *воде дистиллированной Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл.

Раствор разводят *водой дистиллированной Р* в 10 раз непосредственно перед использованием.

Сульфата эталонный раствор (10 ppm SO_4). *5002800.*

Навеску *калия сульфата Р,* соответствующую 0,181 г K_2SO_4, растворяют в *воде дистиллированной Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл.

Раствор разводят *водой дистиллированной Р* в 100 раз непосредственно перед использованием.

Сульфата эталонный раствор (10 ppm SO_4) Р1. *5002801.*

Навеску *калия сульфата Р,* соответствующую 0,181 г K_2SO_4, растворяют в *спирте (30%, об/об) Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл.

Раствор разводят *спиртом (30%, об/об) Р в* 100 раз непосредственно перед использованием.

Сульфита эталонный раствор (1,5 ppm SO_2). *5002900.*

Навеску *натрия метабисульфита Р,* соответствующую 0,152 г $Na_2S_2O_5$, растворяют в *воде Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл.

5,0 мл полученного раствора доводят *водой Р* до объёма 100,0 мл (раствор 1). К 3 мл раствора 1 прибавляют 4,0 мл *0,1 М раствора натрия гидроксида* и доводят объём раствора *водой Р* до 100,0 мл.

Сурьмы эталонный раствор (1 ppm Sb). *5000400.*

Навеску *антимонила калия тартрата Р,* соответствующую 0,274 г $C_4H_4KO_7Sb \cdot 1/2H_2O$, растворяют в 20 мл *кислоты хлористоводородной Р1* и доводят прозрачный раствор *водой Р до* объёма 100,0 мл. К 10,0 мл полученного раствора прибавляют 200 мл *кислоты хлористоводородной Р1* и доводят объём раствора *водой Р до* 1000,0 мл (раствор 1). К 100,0 мл раствора 1 прибавляют 300 мл *кислоты хлористоводородной Р1* и доводят объём раствора *водой Р* до 1000,0 мл.

Разведенные растворы готовят непосредственно перед использованием.

Таллия эталонный раствор (10 ppm Tl). *5003000.*

Навеску *таллия сульфата Р,* соответствующую 0,1235 г $T1_2SO_4$, растворяют в растворе 9 г/л *натрия хлорида Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 1000,0 мл. 10,0 мл полученного раствора доводят раствором 9 г/л *натрия хлорида Р* до объёма 100,0 мл.

Титана эталонный раствор (100 ppm Ti). *5003200.*

100,0 мг *титана Р* растворяют, если необходимо, при нагревании в 100 мл *кислоты хлористоводородной Р,* разведенной *водой Р* до объема 150 мл; дают остыть и доводят *водой Р* до объёма 1000,0 мл.

Ферроцианида эталонный раствор (100 ppm $Fe(CN)_6$). *5001200.*

Навеску *калия ферроцианида Р,* соответствующие 0,20 г $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$, растворяют в *воде Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл.

Раствор разводят *водой Р в* 10 раз непосредственно перед использованием.

Феррицианида эталонный раствор (50 ppm $Fe(CN)_6$). *5001300.*

Навеску *калия феррицианида Р,* соответствующую 0,78 г $K_3Fe(CN)_6$, растворяют в *воде Р,* доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл.

Раствор разводятеодом *Р* в 100 раз непосредственно перед использованием.

Формальдегида эталонный раствор (5 ppm CH_2O). *5001500.*

Навеску *раствора формальдегида Р,* соответствующую 1,0 г CH_2O, разводят *водой Р до* 1 л.

Раствор разводят *водой* Р в 200 раз непосредственно перед использованием.

Фосфата эталонный раствор (200 ppm PO_4). *5004200.*

Навеску *калия дигидрофосфата Р,* соответствующую 0,286 г KH_2PO_4, растворяют в *воде Р,* доводят объём раствора тем же растворителем до 1000,0 мл.

Фосфата эталонный раствор (5 ppm PO_4). *5002200.*

Навеску *калия дигидрофосфата Р,* соответствующую 0,716 г KH_2PO_4, растворяют в *воде Р,* доводят объём раствора тем же растворителем до 1000,0 мл.

Раствор разводят *водой* Р в 100 раз непосредственно перед использованием.

Фторида эталонный раствор (10 ppm F). *5001400.*

Навеску *натрия фторида Р,* соответствующую 0,442 г NaF, предварительно высушенного при температуре 300°С в течение 12 ч, растворяют в *воде Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 1000,0 мл (1 мл = 0,2мг F).

Хранят в полиэтиленовом контейнере.

Раствор разводят *водой Р* в 20 раз непосредственно перед использованием.

Фторида эталонный раствор (1 ppm F). *5001401.*
Эталонный раствор фторида (10 ppm F) Р разводят *водой Р* в 10 раз непосредственно перед использованием.

Хлорида эталонный раствор (8 ppm C1). *5000900.*

Навеску *натрия хлорида Р*, соответствующую 1,32 г NaCl, растворяют в *воде Р и* доводят объём раствора тем же растворителем до 1000,0 мл.

Раствор разводят *водой Р* в 100 раз непосредственно перед использованием.

Хлорида эталонный раствор (5 ppm Cl). *5000901.*
Навеску *натрия хлорида Р,* соответствующую 0,824 г NaCl, растворяют в *воде Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 1000,0 мл.

Раствор разводят *водой Р в* 100 раз непосредственно перед использованием.

Хрома эталонный раствор (0,1% Сг). *5001002.*

Навеску *калия дихромата Р,* соответствующцю 2,83 г $K_2Cr_20_7$, растворяют в *воде Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 1000,0 мл.

Хрома эталонный раствор (100 ppm Cr). *5001000.*

Навеску *калия дихромата Р,* соответствующую 0,283 г $K_2Cr_2O_7$, растворяют в *воде Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 1000,0 мл.

Хрома эталонный раствор (0,1 ppm Cr). *5001001.*

Эталонный раствор хрома (100 ppm Cr) Р разводят *водой Р в* 1000 раз непосредственно перед использованием.

Цинка эталонный раствор (5 мг/мл Zn). *5003400.*

3,15 г *цинка оксида Р* растворяют в 15 мл *кислоты хлористоводородной Р* и доводят объём раствора *водой Р до* 500,0 мл.

Цинка эталонный раствор (100 ppm Zn). *5003401.*

Навеску *цинка сульфата Р,* соответствующую 0,440 г $ZnSO_4·7H_20$, растворяют 1 *мл уксусной кислоты Р* и доводят объём раствора *водой Р* до 100,0 мл.

Раствор разводят *водой Р в* 10 раз непосредственно перед использованием.

Цинка эталонный раствор (10 ppm Zn). *5003402.*

Эталонный раствор цинка (100ppm Zn) Р разводят *водой Р* в 10 раз непосредственно перед использованием.

Цинка эталонный раствор (5 ppm Zn). *5003403.*

Эталонный раствор цинка (100 ppm Zn) Р разводят *водой Р* в 20 раз непосредственно перед использованием.

Циркония эталонный раствор (1 г/л Zr). *5003500.*

Навеску *цирконила нитрата Р,* соответствующую 0,293 г $ZrO(NO,)_2·2H_2O$, растворяют в смеси 2 объёмов *кислоты хлористоводородной Р и* 8 объёмов *воды Р* и доводят объём раствора той же смесью растворителей до 100,0 мл.

4.1.3. БУФЕРНЫЕ РАСТВОРЫ

Забуференный ацетоновый раствор. *4000100.*

8,15 г *натрия ацетата Р* и 42 г *натрия хлорида Р* растворяют в *воде Р,* прибавляют 68 мл *0,1 М раствора кислоты хлористоводородной*, 150 мл *ацетона Р* и доводят объём раствора *водой Р* до 500 мл.

Буферный раствор pH 2,0. *4000200.*

6,57 г *калия хлорида Р* растворяют в *воде Р,* прибавляют 119,0 мл *0,1 М раствора кислоты хлористоводородной* и доводят объём раствора *водой Р* до 1000,0 мл.

Фосфатный буферный раствор pH 2,0. *4007900.*

8,95 г *динатрия гидрофосфата Р* и 3,40 г *калия дигидрофосфата Р* растворяют в *воде Р,* доводят объём раствора тем же растворителем до 1000,0 мл. Если необходимо, доводят pH *(2.2.3) кислотой фосфорной Р.*

Сульфатный буферный раствор pH 2,0. *4008900.*

132,1 г *аммония сульфата Р* растворяют в *воде Р,* доводят объём раствора тем же растворителем до 500,0 мл (раствор I).

Осторожно при постоянном охлаждении и перемешивании 14 мл *кислоты серной Р* прибавляют к приблизительно 400 мл *воды Р;* охлаждают и доводят объём раствора *водой Р до* 500,0 мл (раствор II).

Смешивают равные объёмы растворов I и II. Если необходимо, доводят pH *(2.2.3).*

Буферный раствор pH 2,2. *4010500.*

Смешивают 6,7 мл *кислоты фосфорной Р* с 48,0 мл *воды Р* и 2,0 мл *раствора натрия гидроксида Р* и доводят до 1000,0 мл *воды Р*.

Буферный раствор pH 2,5. *4000300.*

100 г *калия дигидрофосфата Р* растворяют в 800 мл *воды Р,* устанавливают pH *(2.2.3)* 2,5 с помощью *кислоты хлористоводородной Р* и доводят объём раствора *водой Р* до 1000,0 мл.

Буферный раствор pH 2,5 Р1. *4000400.*

К 4,9 г *кислоты фосфорной разведенной Р* прибавляют 250 мл *воды Р,* устанавливают pH *(2.2.3)* с помощью *раствора натрия гидроксида разведённого Р* и доводят объём раствора *водой Р* до 500,0 мл.

Фосфатный буферный раствор pH 2,8. *4010600*.

7,8 г *натрия дигидрофосфата Р* растворяют в 900 мл *воды* Р доводят до pH 2,8 (*2.2.3*) *кислотой фосфорной Р* и доводят *водой Р* до 1000,0 мл.

Буферный раствор pH 3,0. *4008000.*

21,0 г *кислоты лимонной Р* растворяют в 200 мл *1 М раствора натрия гидроксида* и доводят объём раствора *водой Р до* 1000 мл.

40,3 мл полученного раствора доводят *0,1 М раствором кислоты хлористоводородной* до объёма 100,0 мл.

Фосфатный буферный раствор pH 3,0. *4000500.*

0,7 *мл кислоты фосфорной Р* смешивают со 100 мл *воды Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 900 мл. Устанавливают pH *(2.2.3)* 3,0 с помощью *раствора натрия гидроксида концентрированного Р* и доводят объём раствора *водой Р* до 1000 мл.

Фосфатный буферный раствор pH 3.0 Р1.*4010000.*

3,40 г *калия дигидрофосфата Р* растворяют в 900 мл *воды Р.* Устанавливают pH *(2.2.3)* 3,0 с помощью *кислоты фосфорной Р и* доводят объём раствора *водой Р* до 1000.0 мл.

Фосфатный буферный раствор pH 3,2. *4008100*

К 900 мл раствора 4 г/л *натрия дигидрофосфата Р* прибавляют 100 мл раствора 2,5 г/л *кислоты фосфорной Р.* Если необходимо, доводят pH *(2.2.3).*

Фосфатный буферный раствор pH 3,2 Р1.*4008500.*

Устанавливают pH *(2.2.3)* 3,2 раствора 35,8 г/л *динатрия гидрофосфата Р* с помощью *кислоты фосфорной разведенной Р.*

100,0 мл раствора доводят *водой Р* до объёма 2000,0 мл.

Буферный раствор pH 3,5. *4000600.*

25,0 г *аммония ацетата Р* растворяют в 25 мл *воды Р,* прибавляют 38,0 мл *кислоты хлористоводородной Р1.* Если необходимо, устанавливают pH *(2.2.3)* с помощью *кислоты хлористоводородной разведенной Р или раствора аммиака разведенного Р* и доводят объём раствора *водой Р* до 100,0мл.

Фосфатный буферный раствор pH 3,5. *4000700.*

68,0 г *калия дигидрофосфата Р* растворяют в *воде Р,* доводят объём раствора тем же растворителем до 1000,0 мл. Устанавливают pH *(2.2.3)* с помощью *кислоты фосфорной Р.*

Буферный раствор pH 3,6. *4000800.*

К 250,0 мл *0,2 М раствора калия гидрофталата Р* прибавляют 11,94 мл *0,2 М раствора кислоты хлористоводородной* и доводят объём раствора *водой Р* до 1000,0 мл.

Буферный раствор pH 3.7. *4000900.*

К 15,0 мл *кислоты уксусной Р* прибавляют 60 *мл 96% спирта* Р и 20 мл *воды Р;* устанавлин рН *(2.2.3)* 3,7 с помощью *раствора аммиака Р и* доводят объём раствора *водой Р* до 100,0 мл.

Забуференный раствор меди сульфата рН 4,0. *4001000.*

0,25 г *меди (II) сульфата Р* и 4,5 г *аммония ацетата Р* растворяют в *кислоте уксусной разведенной* и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл.

Ацетатный буферный раствор рН 4,4. *4001100.*

136 г *натрия ацетата Р* и 77 г *аммония ацетата Р* растворяют в *воде Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 1000,0 мл, затем прибавляют 250,0 мл *кислоты уксусной ледяной Р и* перемешивают.

Фталатный буферный раствор рН 4,4 4001200.

2,042 г *калия гидрофталата Р* растворяют в 50 мл *воды Р,* прибавляют 7,5 мл *0,2 М раствора натрия гидроксида* и доводят объём раствора *водой Р* до 200,0 мл.

0,05 М фосфатный буферный раствор рН 4,5. *4009000.*

6,80 г *калия дигидрофосфата Р* растворяют 1000,0 мл *воды Р.*

рН *(2.2.3)* раствора должен быть 4,5.

Ацетатный буферный раствор рН 4,5. *4010100.*

63 г *натрия ацетата безводного Р* растворяют *воде Р,* прибавляют 90 мл *кислоты уксусной Р,* устанавливают рН *(2.2.3)* 4,5 и доводят объём раствора *водой Р* до 1000 мл.

Ацетатный буферный раствор рН 4,6.*4001400.*

5,4 г *натрия ацетата Р* растворяют в 50 мл *воды Р,* прибавляют 2,4 г *кислоты уксусной ледяной Р,* доводят *водой Р* до объёма 100,0 мл. Если необходимо, доводят рН *(2.2.3).*

Сукцинатный буферный раствор рН 4,6. *400150*

11,8 г *кислоты янтарной Р* растворяют в смеси 600 мл *воды Р* и 82 мл *1 М раствора натрия гидроксида и доводят объём раствора Р* до 1000,0 мл.

Ацетатный буферный раствор рН 4,7. *4001600.*

136,1 г *натрия ацетата Р* растворяют в 500 мл *воды Р.* 250 мл полученного раствора смешивают с 250 мл *кислоты уксусной разведенной Р.* Встряхивают дважды со свежеприготовленным, отфильтрованным раствором 0,1 г/л *дитизона Р* в *хлороформе Р.* Встряхивают с *углерода тетрахлоридом Р* до обесцвечивания экстракта. Водный слой фильтруют для удаления следов углерода тетрахлорида.

Ацетатный буферный раствор рН 5,0. *4009100.*

К 120 мл раствора 6 г/л *кислоты уксусной ледяной Р* прибавляют 100 мл *0,1 М раствора калия гидроксида* и приблизительно 250 мл *воды Р,* перемешивают. Устанавливают рН 5,0 с помощью раствора 6 г/л *кислоты уксусной Р* или *0,1 М раствора калия гидроксида* и доводят объём полученного раствора *водой Р* до 1000,0 мл.

Цитратный буферный раствор рН 5,0. *4010700.*

Приготовливают раствор содержащий 20,1 г/л *кислоты лимонной* Р и 8,0 г/л *натрия гидроксида Р.* Доводят до рН 5,0 *кислотой хлористоводородной разведенной Р.*

Буферный раствор рН 5,2. *4001700.*

1,02 г *калия гидрофталата Р* растворяют в 30,0 мл *0,1 М раствора натрия гидроксида* и доводят объём раствора *водой Р до* 100,0 мл.

Буферный раствор рН 5,5. *4001800.*

54,4 г *натрия ацетата Р* растворяют в 50 мл *воды Р,* если необходимо, нагревают до температуры 35°С. После охлаждения медленно прибавляют 10 мл *кислоты уксусной безводной Р,* перемешивают и доводят объём раствора *водой Р* до 100,0 мл.

Ацетатно-эдетатный буферный раствор рН 5,5. *4001900.*

250 г *аммония ацетата Р* и 15 г *натрия эдетата Р* растворяют в 400 мл *воды Р* и прибавляют 125 мл *кислоты уксусной ледяной Р.*

Фосфатный буферный раствор рН 5,5. *4002000.*

Растеор 1. 13,61 г *калия дигидрофосфата Р* растворяют в *воде Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 1000,0 мл.

Раствор //. 35,81 г *динатрия гидрофосфата Р* растворяют в *воде Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 1000,0 мл.

Смешивают 96,4 мл раствора 1 и 3,6 мл раствора II.

Фосфатно-цитратный буферный раствор рн 5,5 4008700.
Смешивают 56,85 мл раствора 28,4 г/л *динатрия гидрофосфата безводного Р* и 43,15 мл раствора 21 г/л *кислоты лимонной Р.*

Фосфатный буферный раствор рН 5,8. *4002100.*

1,19 г *динатрия гидрофосфата дигидрата Р* и 8,25 г *калия дигидрофосфата Р* растворяют в *воде Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 1000,0 мл.

Ацетатный буферный раствор рН 6,0. *4002200.*

100 г *аммония ацетата Р* растворяют в 300 мл *воды Р,* прибавляют 4,1 мл *кислоты уксусной ледяной Р.* Если необходимо, устанавливают рН *(2.2.3)* с помощью *раствора аммиака Р* или *кислоты уксусной Р* и доводят объём раствора *водой Р* до 500,0 мл.

Диэтиламмония фосфата буферный раствор рН 6,0. *4002300.*

68 мл *кислоты фосфорной Р* доводят *водой Р* до объёма 500 мл. К 25 мл полученного раствора прибавляют 450 мл *воды Р* и 6 мл *диэтиламина Р,* если необходимо, устанавливают рН *(2.2.3)* 6±0,05 с помощью *диэтиламина Р* или *кислоты фосфорной Р* и доводят объём раствора *водой Р* до 500,0 мл.

Фосфатный буферный раствор рН 6,0.*4002400.*

Смешивают 63,2 мл раствора 71,5 г/л *динатрия гидрофосфата Р* и 36,8 мл раствора 21 г/л *кислоты лимонной Р.*

Фосфатный буферный раствор рН 6,0 Р1.*4002500.*

6,8 г *натрия дигидрофосфата Р* растворяют в *воде Р к* доводят объём раствора *водой Р* до 1000,0 мл. Доводят рН *(2.2.3) раствором натрия гидроксида концентрированным Р.*

Фосфатный буферный раствор рН 6,0 Р2.*4002600.*

К 250,0 мл *0,2 М раствора калия дигидрофосфата Р* прибавляют 28,5 мл *0,2 М раствора натрия гидроксида* и доводят объём раствора *водой Р* до 1000,0мл.

Фосфатный буферный раствор рН 6,4. *4002700.*

1,79 г *динатрия гидрофосфата Р,* 1,36 г *калия дигидрофосфата Р* и 7,02 г *натрия хлорида Р* растворяют в *воде Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 1000,0 мл.

Фосфатный буферный раствор рН 6.4 Р1.*4002800.*

2,5 г *динатрия гидрофосфата Р,* 2,5 г *натрия дигидрофосфата Р* и 8,2 г *натрия хлорида Р* растворяют в 950 мл *воды Р*. Если необходимо, устанавливают рН *(2.2.3)* 6,4 с помощью *1 М раствора натрия гидроксида* или *1 М раствора кислоты хлористоводородной* и доводят объём раствора *водой Р* до 1000,0 мл.

0,5 М фталатный буферный раствор рН 6,4. *4009200.*

100 г *калия гидрофталата Р* растворяют в *воде Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 1000,0 мл. Если необходимо, доводят рН *(2.2.3) раствором натрия гидроксида концентрированным Р.*

Буферный раствор рН 6,5. *4002900.*

60,5 г *динатрия гидрофосфата Р* и 46 г *калия дигидрофосфата Р* растворяют в *воде Р,* прибавляют 100 мл *0,02 М раствора натрия эдетата,* 20 мг *ртути (II) хлорида Р* и доводят объём раствора *водой Р* до 1000,0 мл.

Имидазольный буферный раствор рН 6,5. *4003000.*

6,81 г *имидазола Р* и 1,23 г *магния сульфата Р* растворяют в 752 мл *0,1М раствора кислоты хлористоводородной.* Если необходимо, устанавливают рН *(2.2.3)* и доводят объём раствора *водой Р* до 1000,0 мл.

0,1 М фосфатный буферный раствор рН 6,5. *4010800.*

13,80 г *натрия дигидрофосфата моногидрата Р* растворяют в 900 мл *дистиллированной воды Р*, доводят рН (*2.2.3*) до 6,5, используя 400 г/л раствор *натрия гидроксида Р* и доводят объём раствора *дистиллированной водой Р* до 1000,0 мл.

Фосфатный буферный раствор рН 6,6. *4003100.*

К 250,0 мл *0,2 М раствора калия дигидрофосфата Р* прибавляют 89,0 мл *0,2 М раствора натрия гидроксида* и доводят объём раствора *водой Р* до 1000,0 мл.

Фосфатный забуференный физиологический раствор рН 6,8. *4003200.*

1,0 г *калия дигидрофосфата Р*, 2,0 г *дикалия гидрофосфата Р и* 8,5 *натрия хлорида Р* растворяют в 900 мл *воды Р.* .Если необходимо, устанавливают рН *(2.2.3)* и доводят объём раствора тем же растворителем до 1000,0 мл.

Фосфатный буферный раствор рН 6,8. *4003300.*

Смешивают 77,3 мл раствора 71,5 г/л *динатрия гидрофосфата Р* и 22,7 мл раствора 21 г/л *кислоты лимонной Р.*

Фосфатный буферный раствор рН 6,8 Р1. *4003400.*

К 51,0 мл раствора 27,2 г/л *калия дигидрофосфата Р* прибавляют 49,0 мл раствора 71,6 г/л динатрия *гидрофосфата Р,* если необходимо, доводят рН *(2.2.3).*

Хранят при температуре от 2°С до 8°С.

1 М трис-гидрохлорида буферный раствор рН 6,8. *4009300.*

60,6 г *трис(гидроксиметил)аминометана Р* растворяют в 400 мл *воды Р,* устанавливают pH *(2.2.3)* с помощью *кислоты хлористоводородной Р* и доводят объём раствора *водой Р* до 500,0 мл.

Буферный раствор pH 7,0. *4003500.*

К 1000 мл раствора, содержащего 18 г/л *динатрия гидрофосфата Р* и 23 г/л *натрия хлорида Р,* прибавляют для установления pH *(2.2.3)* достаточное количество (около 280 мл) раствора, содержащего 7,8 г/л *натрия дигидрофосфата Р* и 23 г/л *натрия хлорида Р.* Растворяют в полученном растворе необходимое количество *натрия азида Р* до получения раствора 0,2 г/л.

Малеатный буферный раствор pH 7,0. *4003600.*

10,0 г *натрия хлорида Р,* 6,06 г *трис(гидроксиметил)аминометана Р* и 4,90 г *малеинового ангидрида Р* растворяют в 900 мл *воды Р.* Устанавливают *pH (2.2.3)* с помощью раствора 170 г/л *натрия гидроксида Р* и доводят объём раствора *водой Р* до 1000,0мл.

Хранят при температуре от 2°С до 8°С. Срок годности 3 сут.

Фосфатный буферный раствор pH 7,0. *4003700.*

Смешивают 82,4 мл раствора 71,5 г/л *динатрия гидрофосфата Р с* 17,6 мл раствора 21 г/л *кислоты лимонной Р.*

0,025 М фосфатный буферный раствор pH 7,0. *4009400.*

Смешивают 1 объём *0,063 М фосфатного буферного раствора pH 7,0 Р с 1,5* объёмами *воды Р.*

0,063 М фосфатный буферный раствор pH 7,0. *4009500.*

5,18 г *динатрия гидрофосфата безводного Р* и 3,65 г *натрия дигидрофосфата моногидрата Р* растворяют в 950 мл *воды Р,* устанавливают pH *(2.2.3)* с помощью *кислоты фосфорной Р* и доводят объём раствора *водой Р* до 1000,0 мл.

0,067 М фосфатный буферный раствор pH 7,0. *4003800.*

Раствор I. 0,908 г *калия дигидрофосфата Р* растворяют в *воде Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл.

Раствор //. 2,38 г *динатрия гидрофосфата Р* растворяют в *воде Р и* доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл.

Смешивают 38,9 мл раствора I и 61,1 мл раствора II и, если необходимо, доводят pH *(2.2.3).*

0,1 М фосфатный буферный раствор pH 7,0. *4008200.*

1,361 г *калия дигидрофосфата Р* растворяют в *воде Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл. Доводят pH *(2.2.3)* раствором 135 г/л *динатрия гидрофосфата Р.*

0,03 М фосфатный буферный раствор pH 7,0. *4010300.*

5,2 г *дикалия гидрофосфата Р* растворяют в 900 мл *воды для хроматографии Р.* Устанавливают pH 7,0±0,1 с помощью *кислоты фосфорной Р* и доводят объём раствора *водой для хроматографии Р* до 1000 мл.

Фосфатный буферный раствор pH 7,0 Р1 *4003900.*

Смешивают 250,0 мл *0,2 М раствора калия дигидрофосфата Р* и 148,2 мл раствора 8 г/л *натрия гидроксида Р,* если необходимо, устанавливают pH *(2.2.3)* и доводят объём раствора *водой Р* до 1000,0 мл.

Фосфатный буферный раствор pH 7,0 Р2.*4004000.*

Смешивают 50,0 мл раствора 136 г/л *калия дигидрофосфата Р* и 29,5 мл *1 М раствора натрия гидроксида,* доводят объём раствора *водой Р* до 100,0 мл и устанавливают pH *(2.2.3)* 7,0± 0,1.

Фосфатный буферный раствор pH 7,0 Р3. 4008600.

5 г *калия дигидрофосфата Р* и 11 г *дикалия гидрофосфата Р* растворяют в 900 мл *воды Р.* Устанавливают pH *(2.2.3)* 7.0 с помощью *кислоты фосфорной разведенной Р* или *раствора натрия гидроксида разведенного Р,* доводят объём раствора *водой Р* до 1000 мл и перемешивают.

Фосфатный буферный раствор pH 7,0 Р4.*4010200.*

28,4 г *динатрия гидрофосфата безводного Р* и 18,2 г *калия дигидрофосфата Р* растворяют в *воде Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 500 мл.

Буферный раствор pH 7,2. *4004100.*

К 250,0 мл *0,2 М раствора калия дигидрофосфата Р* прибавляют 175,0 мл *0,2 М раствора натрия гидроксида.* Доводят объём раствора *водой Р* до 1000,0 мл и, если необходимо, доводят pH *(2.2.3).*

Фосфатный буферный раствор pH 7,2. *4004200.*

Смешивают 87,0 мл раствора 71,5 г/л *динатрия гидрофосфата Р* и 13,0 мл раствора 21 г/л *кислоты лимонной Р.*

Забуференный солевой раствор pH 7,2. *4004300.*

8,0 г *натрия хлорида Р,* 0,2 с *калия хлорида Р*, 0,1 г *кальция хлорида безводного Р*, 0,1 г *магния хлорида Р*, 3,18 г *динатрия гидрофосфата Р* и 0,2 г *калия дигидрофосфата Р* растворяют в *воде Р* и доводят объём раствора *водой Р* до 1000,0 мл.

Фосфатно-альбуминовый забуференный физиологический раствор pH 7,2. *4004400.*

10,75 г *динатрия гидрофосфата Р,* 7,6 г *натрия хлорида Р* и 10 г *альбумина бычьего Р* растворяют в *воде Р* и доводят тем же растворителем до объёма 1000,0 мл.

Непосредственно перед использованием устанавливают pH *(2.2.3)* с помощью *раствора натрия гидроксида разведенного Р* или *кислоты фосфорной разведенной Р.*

Фосфатно-альбуминовый забуференный физиологический раствор pH 7,2 Р1. *4009600.*

10,75 г *динатрия гидрофосфата Р,* 7,6 г *натрия хлорида Р* и 1 г *альбумина бычьего Р* растворяют в *воде Р* и доводят тем же растворителем до объёма 1000,0 мл.

Непосредственно перед использованием доводят pH *(2.2.3) раствором натрия гидроксида разведенным Р* или *кислотой фосфорной разведенной Р.*

Имидазольный буферный раствор pH 7,3. 4004500.

3,4 г *имидазола Р* и 5,8 г *натрия хлорида Р* растворяют в *воде Р,* прибавляют 18,6 мл *1 М раствора кислоты хлористоводородной* и доводят объём раствора *водой Р* до 1000,0 мл и, если необходимо, доводят pH *(2.2.3).*

Буферный раствор pH 7,4. *4004600.*

0,6 г *калия дигидрофосфата Р*, 6,4 г *динатрия гидрофосфата Р* и 5,85 г *натрия хлорида Р* растворяют в *воде Р,* доводят объём раствора тем же растворителем до 1000,0 мл и, если необходимо, доводят pH *(2.2.3).*

Барбитал-буферный раствор pH 7,4. *4004700.*

Смешивают 50 мл раствора, содержащего 19,44 г/л *натрия ацетата Р* и 29,46 г/л *барбитал-натрия Р* в *воде Р,* и 50,5 мл *0,1 М раствора кислоты хлористоводородной,* прибавляют 20 мл раствора 85 г/л *натрия хлорида Р* и доводят объём раствора *водой Р* до 250 мл.

Фосфатный буферный раствор pH 7,4. *4004800.*

К 393,4 мл *0,1 М раствора натрия гидроксида* прибавляют 250,0 мл *0,2 М раствора калия дигидрофосфата Р.*

Трис(гидроксиметил)аминометан-натрия хлорид буферный раствор pH 7,4. *4004900.*

6,08 г *трис(гидроксиметил)аминометана Р* и 8,77 г *натрия хлорида Р* растворяют в 500 мл *воды дистиллированной Р,* прибавляют 10,0 г *альбумина бычьего Р.* Устанавливают pH *(2.2.3)* с помощью *кислоты хлористоводородной Р* и доводят объём раствора *водой дистиллированной Р* до 1000,0 мл.

Фосфатный забуференный физиологический раствор pH 7,4. *4005000.*

2,38 г *динатрия гидрофосфата Р,* 0,19 г *калия дигидрофосфата Р* и 8,0 г *натрия хлорида Р* растворяют в *воде Р,* доводят объём раствора тем же растворителем до 1000,0 мл и, если необходимо, доводят pH *(2.2.3).*

Боратный буферный раствор pH 7,5. *4005200.*

2,5 г *натрия хлорида Р,* 2,85 г *динатрия тетрабората Р* и 10,5 г *кислоты борной Р* растворяют в *воде Р,* доводят объём тем же растворителем до 1000,0 мл, и, если необходимо, доводят pH *(2.2.3).*

Хранят при температуре от 2°C до 8°C.

Буферный (HEPES) раствор pH 7,5. *4009700.*

2,38 г *кислоты 2-[4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-ил]этансульфоновой Р* растворяют в около 90 мл *воды Р,* устанавливают pH 7,5 с помощью *раствора натрия гидроксида Р* и доводят объём раствора *водой Р* до 100 мл.

0,33 М фосфатный буферный раствор pH 7,5. *4005300.*

Раствор I. 119,31 г *динатрия гидрофосфата Р* растворяют в *воде Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 1000,0 мл.

Раствор II. 45,36 г *калия дигидрофосфата Р* растворяют в *воде Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 1000,0 мл.
Смешивают 85 мл раствора I и 15 мл раствора II и, если необходимо, доводят pH *(2.2.3).*

0,2 М фосфатный буферный раствор pH 7,5.*4005400.*

27,22 г *калия дигидрофосфата Р* растворяют в 930 мл *воды Р,* устанавливают pH *(2.2.3)* 7,5 с помощью раствора 300 г/л *калия гидроксида Р* и доводят объём раствора *водой Р* до 1000,0 мл.

Трис(гидроксиметил)аминометан-буферный твор pH 7,5. *4005500.*

7,27 г *трис(гидроксиметил)аминометана Р* и 5,27 г *натрия хлорида Р* растворяют в *воде Р,* если не обходимо, устанавливают pH *(2.2.3)* и доводят объем раствора *водой Р*до 1000,0 мл.

0,05 М трис-гидрохлорида буферный раствор pH 7,5. *4005600.*

6,057 г *трис(гидроксиметил)аминометана Р* растворяют в *воде Р,* если необходимо, устанавливают pH *(2.2.3)* с помощью *кислоты хлористоводородной Р* и доводят объём раствора *водой Р* до 1000,0 мл.

Натрия цитрата буферный раствор pH 7,8 (0,034 М раствор натрия цитрата и 0,101 М раствор натрия хлорида). *4009800.*

10,0 г *натрия цитрата Р* и 5,90 г *натрия хлорида Р* растворяют в 900 мл *воды Р,* устанавливают pH *(2.2.3)* с помощью *кислоты хлористоводородной Р* и доводят объём раствора *водой Р* до 1000 мл.

Буферный раствор pH 8,0. *4005900.*

К 50,0 мл *0,2 М раствора калия дигидрофосфата* прибавляют 46,8 мл *0,2 М раствора натрия гидроксида* и доводят объём раствора *водой Р* 200,0 мл.

Буферный раствор pH 8,0 Р1. *4010400.*

20 г *дикалия гидрофосфата Р* растворяют в 900 мл *воды Р,* устанавливают pH *(2.2.3)* с помощью кис*лоты фосфорной Р* и доводят объём раствора *водой Р* до 1000 мл.

0,0015 М боратный буферный раствор pH 8,0. 4006000.

0,572 г *динатрия тетрабората Р* и 2,94 г *кальция хлорида Р* растворяют в 800 мл *воды Р*. Устанавливают pH (2.2.3) с помощью *1 М раствора кислоты хлористоводородной* и доводят объём раствора *водой Р* до 1000,0 мл.

1М фосфатный буферный раствор pH 8,0.*4007800.*

136,1 г *калия дигидрофосфата Р* растворяют в *воде Р,* устанавливают pH *(2.2.3)* с помощью *1 М раствора натрия гидроксида* и доводят объём раствора *водой Р* до 1000,0 мл.

0,1 М фосфатный буферный раствор pH 8,0. *4008400.*

0,523 г *калия дигидрофосфата Р* и 16,73 г *дикалия гидрофосфата Р* растворяют в *воде Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 1000,0 мл.

0,02 М фосфатный буферный раствор pH 8,0. *4006100.*

К 50,0 мл *0,2 М раствора калия дигидрофосфата Р* прибавляют 46,8 мл *0,2 М раствора натрия гидроксида* и доводят объём раствора *водой Р* до 500,0 мл.

Трис(гидроксиметил)аминометан-буферный раствор pH 8,1. *4006200.*

0,294 г *кальция хлорида Р* растворяют в 40 *мл раствора трис(гидроксиметил)аминометана Р,* устанавливают pH *(2.2.3)* с помощью *1 М раствора кислоты хлористоводородной* и доводят объём раствора *водой Р* до 100,0 мл.

Трис-глицин-буферный раствор pH 8,3. *4006300.*

6,0 г *трис(гидроксиметил)аминометана Р* и 28,8 г *глицина Р* растворяют в *воде Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 1000,0 мл.

Непосредственно перед использованием к 1 объёму прибавляют 10 объёмов *воды Р.*

Аминоуксусная буферная смесь с pH 8,3.

Растворяют в *воде Р* 8,4 г *натрия гидрокарбоната Р*, 10 г *калия гидрокарбоната Р*, 7,7 г *глицина (кислоты аминоуксусной) Р*, 4 мл *раствора аммиака концентрированного Р* и доводят объем *водой Р* до 100,0 мл.

Барбитал-буферный раствор pH 8,4. *4006400.*

8,25 г *барбитал-натрия Р* растворяют в *воде Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 1000,0 мл.

Трис-EDTA-BSA буферный раствор pH 8,4.*4006500.*

6,1 г *трис(гидроксиметил)аминометана Р,* 2,8 г *натрия эдетата Р,* 10,2 г *натрия хлорида Р* и 10 г *альбумина бычьего Р* растворяют в *воде Р,* устанавливают pH *(2.2.3)* 8,4 с помощью *1 М раствора кислоты хлористоводородной* и доводят объём раствора *водом Р* до 1000,0 мл.

Трис(гидроксиметил)аминометан- EDTA буферный раствор pH 8,4. *4006600.*

5,12 г *натрия хлорида Р,* 3,03 г *трис(гидроксиметил)аминометана Р* и 1,40 г *натрия эдетата Р* растворяют в 250 мл *воды дистиллированной Р,* устанавливают pH *(2.2.3)* 8,4 с помощью *кислоты хлористоводородной Р* и доводят объём раствора *водой дистиллированной Р* до 500,0 мл.

Трис-ацетатный буферный раствор pH 8,5.*4006700.*

0,294 г *кальция хлорида Р* и 12,11 г *трис-(гидроксиметил)аминометана Р* растворяют в *воде Р,* устанавливают pH *(2.2.3)* с помощью *кислоты уксусной Р* и доводят объём раствора *водой Р* до 1000,0 мл.

Барбитал-буферный раствор pH 8,6 Р1. *4006900.*

1,38 г *барбитала Р*, 8,76 г *барбитал-натрия Р* и 0,38 г *кальция лактата Р* растворяют в *воде Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 1000,0 мл.

1,5 М трис-гидрохлорида буферный раствор pH 8,8. *4009900.*

90,8 г *трис(гидроксиметил)аминометана Р* растворяют в 400 мл *воды Р,* устанавливают pH *(2.2.3) с промощью кислоты хлористоводородной Р* и доводят объём раствора *водой Р* до 500,0 мл.

Буферный (фосфатный) раствор pH 9,0.*4008300.*

1,74 г *калия дигидрофосфата Р* растворяют в 80 мл *воды Р,* если необходимо, устанавливают pH *(2.2.3)* с *помощью 1 М раствора калия гидроксида* и доводят объём раствора *водой Р* до 100,0мл.

Буферный раствор pH 9,0. *4007000.*

Раствор I. 6,18 г *кислоты борной Р* растворяют в *0,1 М растворе калия хлорида Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 1000,0 мл.

Раствор II. 0,1 М раствор натрия гидроксида.

Смешивают 1000,0 мл раствора I и 420,0 мл раствора II.

Буферный раствор pH 9,0 Р1. *4007100.*

6,20 г *кислоты борной Р* растворяют в 500 мл *воды Р*, устанавливают pH *(2.2.3)* с помощью *1 М раствора натрия гидроксида* (около 41,5 мл) и доводят объём раствора *водой Р* до 1000,0 мл.

Аммиачный буферный раствор pH 9,5. *4007200.*

33,5 г *аммония хлорида Р* растворяют в 150 мл *воды Р,* прибавляют 42,0 *мл раствора аммиака концентрированного Р* и доводят объём раствора *водой Р* до 250,0 мл.

Хранят в полиэтиленовом контейнере.

Аммиачный буферный раствор рН 10,0. *4007300.*

5,4 г *аммония хлорида Р* растворяют в 20 мл *воды Р,* прибавляют 35,0 мл *раствора аммиака Р* и доводят объём раствора *водой Р* до 100,0 мл.

Диэтаноламин-буферный раствор рН 10,0.*4007500.*

96,4 г *диэтаноламина Р* растворяют в *воде Р,* доводят объём раствора тем же растворителем до 400 мл, прибавляют 0,5 мл раствора 186 г/л *магния хлорида Р,* устанавливают рН *(2.2.3)* с помощью *1 М раствора кислоты хлористоводородной* и доводят объём раствора *водой Р* до 500,0 мл.

Аммония хлорида буферный раствор рН 10,4.*4011000.*

70 г *аммония хлорида Р* растворяют в 200 мл *воды Р*, добавляют 330 мл *аммиака раствора концентрированного Р* и доводят *водой Р* до 1000,0 мл. При необходимости, доводят до рН 10,4 *раствором аммиака Р*.

Боратный буферный раствор рН 10,4.*4011100.*

24,64 г *кислоты борной Р* растворяют в 900 мл *дистиллированной воды Р*. Доводят до рН 10,4 (*2.2.3*), используя раствор 400 г/л *натрия гидроксида Р*. Доводят *дистиллированной водой Р* до 1000,0 мл.

Буферный раствор рН 10,9. *4007600.*

6,75 г *аммония хлорида Р* растворяют в *растворе аммиака Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0мл.

Буфер для регулирования ионной силы. *4007700.*

58,5 г *натрия хлорида Р,* 57,0 мл *кислоты уксусной ледяной Р,* 61,5 г *натрия ацетата Р* и 5,0 г *циклогексилендинитрилтетрауксусной кислоты Р* растворяют в *воде Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 500,0 мл. Устанавливают рН 5,0-5,5 с помощью раствора 335 г/л *натрия гидроксида Р* и доводят объём раствора *водой дистиллированной Р* до 1000,0 мл.

Буфер для регулирования ионной силы Р1. *4008800.*

Раствор (а). 210 г *кислоты лимонной Р* растворяют в 400 мл *воды дистиллированной Р,* устанавливают рН *(2.2.3)* 7,0 с *помощью раствора аммиака концентрированного Р* и доводят объём раствора *водой дистиллированной Р* до 1000,0 мл.

Раствор (b). 132 г *аммония фосфата Р* растворяют в *воде дистиллированной Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 1000,0 мл.

Раствор (с). К суспензии 292 г *(этилендинитрил)тетрауксусной кислоты Р* приблизительно в 500 мл *воды дистиллированной Р* прибавляют около 200 мл *раствора аммиака концентрированного Р.* Устанавливают рН *(2.2.3)* 6-7 с помощью *раствора аммиака концентрированного Р* и доводят объём раствора *водой дистиллированной Р* до 1000,0 мл.

Смешивают равные объемы растворов (а), (b) и (с) и доводят рН до 7,5 *раствором аммиака концентрированным Р.*

4.2. РЕАКТИВЫ, ТИТРОВАННЫЕ РАСТВОРЫ ДЛЯ ОБЪЕМНОГО НАЛИЗА

4.2.1. ИСХОДНЫЕ СТАНДАРТНЫЕ ВЕЩЕСТВА ДЛЯ ТИТРОВАННЫХ РАСТВОРОВ

Исходные стандартные вещества для установки титра титрованных растворов обозначают буквами РО и готовят следующим образом.

Калия бромат. $KBrO_3$. *(М.м.* 167,0). *2000300.* [7758-01-2].

Калия бромат Р перекристаллизовывают из кипящей *воды Р.* Кристаллы собирают и сушат до постоянной массы при температуре 180°С.

Калия гидрофталат. $C_8H_5KO_4$. *(М.м.* 204,2). *2000400.* [877-24-7].

Калия гидрофталат Р перекристаллизовывают из кипящей *воды Р.* Кристаллы собирают при температуре выше 35°С и сушат до постоянной массы при температуре 110°С.

Кислота бензойная. $C_7H_6O_2$ *(М.м. 122,1). 2000200.* [65-85-0].

Кислоту бензойную Р сублимируют.

Мышьяка (III)оксид. As_2O_3. *(М.м.* 197,8). *2000100.* [1327-53-3].

Мышьяка (III) оксид Р сублимируют.

Хранят над *силикагелем безводным Р.*

Натрия карбонат. Na_2CO_3. *(М.м.* 106,0). *2000500.* [497-19-8].

Насыщенный раствор *натрия карбоната Р* фильтруют при комнатной температуре. Через фильтрат медленно пропускают поток *углерода диоксида Р* при постоянном охлаждении и перемешивании. Через 2 ч осадок собирают на стеклянном фильтре, промывают фильтр ледяной *водой Р,* насыщенной углерода диоксидом. Сушат при температуре от 100°С до 105°С и прокаливают до постоянной массы при температуре от 270°С до 300°С, периодически перемешивая.

Натрия хлорид. NaCl. *(М.м.* 58,44). *2000600.* [7647-14-5].
К 1 объёму насыщенного раствора *натрия хлорида Р* прибавляют 2 объёма кислоты хлористоводородной *Р*. Полученные кристаллы собирают и промывают *кислотой хлористоводородной Р1,* которую удаляют нагреванием на водяной бане. Прокаливают до постоянной массы при температуре 300°С.

Сульфаниловая кислота. $C_6H_7NO_3S$. *(М.м.* 173,2). *2000700.* [121-57-31.

Кислоту сульфаниловую Р перекристаллизовывают из кипящей *воды Р,* фильтруют и сушат до постоянной массы при температуре от 100°С до 105°С.

Цинк. Zn. *(А.м.* 65,4). *2000800.* [7440-66-6].

Используют цинк с содержанием не менее 99,9% Zn.

4.2.2. ТИТРОВАННЫЕ РАСТВОРЫ

Титрованные растворы должны готовиться в соответствии с обычными требованиями химического анализа. Проверяют точность используемого оборудования для того, чтобы удостовериться в его пригодности для предполагаемого применения.

Концентрацию титрованных растворов выражают их молярностью. Молярность выражает количество вещества, растворенного в 1 л раствора, в виде количества молей. Раствор, содержащий c молей вещества в одном литре, обозначают c М раствором.

Концентрация титрованных растворов не должна отличаться от указанной более чем на 10%. Молярность титрованных растворов определяют с точностью 0,2%.

Титрованные растворы стандартизуют описанными ниже методами. Если титрованный раствор используют в количественном анализе, в котором конечную точку определяют электрохимическим методом (например, амперометрии или потенциометрии), раствор стандартизуют тем же методом. Состав среды, в которой стандартизуют титрованный раствор, должен быть таким же, как и тот, в котором он будет использован.

Растворы более разведенные, чем описанные ниже, получают разведением последних *водой, свободной от углерода диоксида, Р.* Поправочные коэффициенты полученных растворов такие же, как у исходных растворов. Растворы с молярностью ниже 0,1 М готовят непосредственно перед использованием.

1**М раствор азотной кислоты.** *3003600.*

96,6 г *кислоты азотной* Р доводят *водой Р* до объёма 1000,0 мл.

Установка титра. 1,000 г *натрия карбоната РО* растворяют в 50 мл *воды Р,* прибавляют 0,1 мл *раствора метилового оранжевого Р* и титруют приготовленным раствором кислоты азотной до красновато-жёлтого окрашивания; кипятят в течение 2 мин, раствор снова приобретает жёлтую окраску, охлаждают и продолжают титрование до красновато-желтого окрашивания.

1 мл *1 М раствора кислоты азотной* соответствует 53,00 мг Na_2CO_3.

0,1 М раствор аммония тиоцианата. *3000500.*

7,612 г *аммония тиоцианата Р* растворяют в *воде Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 1000,0 мл.

Установка титра. К 20,0 мл *0,1 М раствора серебра нитрата* прибавляют 25 мл *воды Р, 2* мл *кислоты азотной разведенной Р, 2* мл *раствора железа (III) аммония сульфата Р2* и титруют приготовленным раствором аммония тиоцианата до появления красновато-желтого окрашивания.

0,1 М раствор аммония церия нитрата. *3000100.*

Раствор, содержащий 56 мл *кислоты серной Р* и 54.82 г *аммония церия (IV) нитрата Р,* взбалтывают в течение 2 мин, прибавляют последовательно пять порций, по 100 мл каждая, *воды Р,* перемешивая после каждого прибавления. Доводят объём прозрачного раствора *водой* Р до 1000,0 мл. Титр полученного раствора устанавливают через 10 сут.

Установка титра. К 25,0 мл приготовленного раствора аммония церия (IV) нитрата прибавляют 2,0 г *калия йодида Р* и 150 мл *воды Р*. Немедленно *титруют 0,1 М раствором натрия тиосульфата*, используя 1 мл *раствора крахмала Р* в качестве индикатора.

Хранят в защищённом от света месте.

0,01 М раствор аммония церия нитрата. *3000200.*

К 100,0 мл *0,1 М раствора аммония церия нитрата* прибавляют при охлаждении 30 мл *кислоты серной Р* и доводят объём раствора *водой Р* до 1000,0 мл.

0,1 М раствор аммония церия сульфата. *3000300.*

65.0 г *аммония церия (IV) сульфата Р* растворяют в смеси 500 мл *воды Р* и 30 мл *кислоты серной Р;* охлаждают и доводят объём раствора *водой Р* до 1000,0 мл.

Установка титра. К 25,0 мл приготовленного раствора аммония церия (IV) сульфата прибавляют 2,0 г *калия йодида Р* и 150 мл *воды Р*. Немедленно *титруют 0,1 М раствором натрия тиосульфата*, используя 1 мл *раствора крахмала Р* в качестве индикатора.

0,01 М раствор аммония церия сульфата. *3000400.*

К 100,0 мл *0,1 М раствора аммония церия сульфата Р* прибавляют при охлаждении 30 мл *кислоты серной Р* и доводят объём раствора *водой Р* до 1000,0мл.

0,05 М раствор бария перхлората. *3000700.*

15,8 г *бария гидроксида Р* растворяют в смеси 75 мл *воды Р* и 7,5 мл *кислоты хлорной Р,* доводят pH раствора до 3 *кислотой хлорной Р* и фильтруют, если необходимо. Прибавляют 150 мл *96% спирта Р,* разводят *водой Р* до объёма 250 мл и доводят объём раствора *буферным раствором pH 3,7 Р* до 1000,0 мл.

Установка титра. К 5,0 мл *0,05 М раствора кислоты серной* прибавляют 5 мл *воды Р,* 50 мл *буферного раствора pH 3,7,* 0,5 мл *раствора ализарина S Р* и титруют приготовленным раствором бария перхлората до появления оранжево-красного окрашивания.

Титр устанавливают непосредственно перед использованием.

0,025 М раствор бария перхлората. *3009600.*

500,0 мл 0,05 *М раствора бария перхлората* доводят *буферным раствором pH 3,7 Р* до объёма 1000,0мл.

0,1 М раствор бария хлорида. *3000600.*

24,4 г *бария хлорида Р* растворяют в *воде Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 1000,0 мл.

Установка титра. К 10,0 мл приготовленного раствора бария хлорида прибавляют 60 мл *воды Р,* 3 *мл раствора аммиака концентрированного Р,* 0,5-1 мг *фталеинового пурпурового Р* и титруют *0,1 М раствором натрия эдетата.* Когда окраска раствора начнет ослабевать, прибавляют 50 мл *96% спирта Р* и продолжают титрование до исчезновения синевато-фиолетового окрашивания.

0,004 М раствор бензэтония хлорида. *3000900.*

1,792 г *бензэтония хлорида Р,* предварительно высушенного до постоянной массы при температуре от 100°С до 105°С, растворяют в *воде Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 1000,0 мл.

Установка титра. Вычисляют молярность раствора, исходя из содержания $C_{27}H_{42}ClNO_2$ в высушенном бензэтония хлориде, определенного следующим образом. 0,350 г высушенного вещества растворяют в 30 мл *кислоты уксусной безводной Р,* прибавляют 6 мл *раствора ртути (II) ацетата Р* и титруют *0,1 М раствором кислоты хлорной,* используя в качестве индикатора 0,05 мл *раствора кристаллического фиолетового Р.* Паралельно проводят контрольный опыт.

1 мл *0,5 М раствора кислоты хлорной* соответствует 44,81 мг $C_{27}H_{42}ClN0_2$.

0,0167 М раствор бромид-бромата. *3001000.*

2,7835 г *калия бромата РО* и 13 г *калия бромида Р* растворяют в *воде Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 1000,0 мл.

0,1 М раствор железа аммония сульфата. *3001300.*

50,0 г *железа (III) аммония сульфата Р* растворяют в смеси 6 мл *кислоты серной Р* и 300 мл *воды Р* и доводят объём раствора *водой Р* до 1000,0 мл.

Установка титра. К 25,0 мл приготовленного раствора железа аммония сульфата прибавляют *кислоты хлористоводородной Р,* 2 г *калия йодида Р* и через 10 мин титруют *0,1 М раствором* натрия *тиосульфата,* используя в качестве индикатора 1мл *раствора крахмала Р.*

1мл *0,1 М раствора натрия тиосульфата* соответствует 48,22 мг $FeNH_4(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$.

0,1 М раствор железа сульфата. *3001400.*

27,80 г *железа (II) сульфата Р* растворяют в 500 мл кислоты *серной разведенной Р* и доводят объём раствора *водой Р* до 1000,0 мл.

Установка титра. К 25,0 мл приготовленного раствора железа сульфата прибавляют 3 мл кислоты *фосфорной Р* и тотчас титруют *0,02 М раствором калия перманганата.*

Титр устанавливают непосредственно перед использованием.

0,5 М раствор йода. *3009400.*

127 г *йода Р* и 200 г *калия йодида Р* растворяют в *воде Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 1000.0 мл.

Установка титра. К 2,0 мл приготовленного раствора йода прибавляют 1 мл *раствора кислоты уксусной разведенной Р* и 50 мл *воды Р* и титруют *0,1 М раствором натрия тиосульфата*, используя в качестве индикатора *раствор крахмала Р.*

Хранят в защищённом от света месте.

0,05 М раствор йода. *3002700.*

12.7 г *йода* Р и 20 г *калия йодида Р* растворяют в *воде Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 1000.0 мл.

Установка титра. К 20,0 мл приготовленного раствора йода прибавляют 1 мл *раствора кислоты уксусной разведенной Р* и 30 мл *воды Р* и титруют *0,1 М раствором натрия тиосульфата*, используя в качестве индикатора *раствор крахмала Р.*

Хранят в защищённом от света месте.

0,01 М раствор йода. *3002900.*

0,3 г *калия йодида Р* растворяют в 20.0 мл *0,05 М раствора йода* и доводят объём раствора *водой Р* до 100,0 мл.

0,033 М раствор калия бромата. *3004200.*

5,5670 г *калия бромата РО* растворяют в *воде Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 1000,0 мл.

0,02 М раствор калия бромата. *3004300.*

3,340 г *калия бромата РО* растворяют в *воде Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 1000,0 мл.

0,0167 М раствор калия бромата. *3004400.*

Готовят разведением *0,033 М раствора калия бромата.*

0,083 М раствор калия бромата. *3004500.*

Готовят разведением *0,033 М раствора калия бромата.*

1 М раствор калия гидроксида. *3009100.*

60 г *калия гидроксида Р* растворяют в *воде, свободной от углерода диоксида, Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 1000,0 мл.

Установка титра. 20,0 мл приготовленного раствора калия гидроксида титруют *1 М раствором кислоты хлористоводородной,* используя в качестве индикатора 0,5 мл *раствора фенолфталеина Р.*

0,1 М раствор калия гидроксида. *3004800.*

6 г *калия гидроксида Р* растворяют в *воде, свободной от углерода диоксида, Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 1000,0 мл.

Установка титра. 20,0 мл приготовленного раствора калия гидроксида титруют *0,1 М раствором кислоты хлористоводородной,* используя в качестве индикатора 0,5 мл *раствора фенолфталеина Р.*

0,5 М раствор калия гидроксида в спирте *(60%, об/об). 3004900.*

3 г *калия гидроксида Р* растворяют в *спирте (60%, об/об), свободном от альдегидов, Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 100,0 мл.

Установка титра. 20,0 мл приготовленного раствора калия гидроксида в спирте (60*%, об/об)* титруют *0,5 М раствором кислоты хлористоводородной,* используя в качестве индикатора 0,5 мл *раствора фенолфталеина Р.*

0,5 М раствор калия гидроксида спиртовый. *3005000.*

3 г *калия гидроксида Р* растворяют в 5 мл *воды Р* и доводят объём раствора *96% спиртом, свободным от альдегидов, Р* до 100,0 мл.

Установка титра. 20,0 мл приготовленного раствора калия гидроксида спиртового титруют *0,5 М раствором кислоты хлористоводородной,* используя в качестве индикатора 0,5 *мл раствора фенолфталеина Р.*

0,1 М раствор калия гидроксида спиртовый. *3005100.*

20 мл *0,5 М раствора калия гидроксида спиртового* доводят *96% спиртом, свободным от альдегидов, Р* до объёма 100,0 мл.

0,01 М раствор калия гидроксида спиртовый. *3009000.*

2,0 мл *0,5 М раствора калия гидроксида спиртового* доводят *96% спиртом, свободным от альдегидов, Р* до объёма 100,0 мл.

0,1 М раствор калия гидрофталата. *3004700.*

Около 800 мл *кислоты уксусной безводной Р* помещают в коническую колбу, прибавляют 20,42 г *калия гидрофталата РО* и нагревают на водяной бане до растворения, защищая от действия влаги. Охлаждают до температуры 20°С и доводят объём раствора *кислотой уксусной безводной Р* до 1000,0 мл.

0,0167 М раствор калия дихромата. *3004600.*

4,90 г *калия дихромата Р* растворяют в *воде Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 1000,0 мл.

Установка титра. К 20,0 мл приготовленного раствора калия дихромата прибавляют 1 г *калия йодида Р, 7 мл кислоты хлористоводородной разведенной Р,* 250 мл *воды Р* и титруют *0,1 М раствором натрия тиосульфата* до перехода окраски от синей к светло-зелёной, используя в качестве индикатора 3 *мл раствора крахмала Р.*

0,05 М раствор калия йодата. *3005200.*

10,70 г *калия йодата Р* растворяют в *воде Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 1000,0мл.

Установка титра. 25,0 мл приготовленного раствора калия йодата доводят *водой Р* до объема 100,0 мл. К 20,0 мл полученного раствора прибавляют 2 г *калия йодида Р*, 10 мл *кислоты серной разведенной Р* и титруют *0,1 М раствором натрия тиосульфата,* используя в качестве индикатора 1 мл *раствора крахмала Р,* прибавляемого в конце титрования.

0,001 М раствор калия йодида. *3009200.*

10,0 мл *раствора калия йодида Р* 166 г/л доводят *водой Р* до объёма 100,0 мл. 5 мл полученного раствора доводят *водой Р* до объёма 500,0 мл.

0,02 M раствор калия перманганата. *3005300.*

3,2 г *калия перманганата Р* растворяют в *воде Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 1000,0 мл; полученный раствор нагревают на водяной бане в течение 1 ч, охлаждают и фильтруют через стеклянный фильтр.
Установка титра. К 20,0 мл приготовленного раствора калия перманганата прибавляют 2 г калия *йодида Р,* 10 мл *кислоты серной разведенной Р и тит*руют 0,1 *М раствором натрия тиосульфата,* используя в качестве индикатора 1 мл *раствора крахмала Р,* прибавляемого в конце титрования.

Титр устанавливают непосредственно перед использованием.

Хранят в защищённом от света месте.

0,1 M раствор лития метилата. *3003300.*

0,694 г *лития Р* растворяютв 150 мл *метанола безводного Р и* доводят объём раствора *толуолом* Р до 1000,0мл.

Установка титра. К 10 мл *диметилформамида Р при*бавляют 0,05 мл раствора 3 г/л *тимолового синего Р* в *метаноле Р* и титруют приготовленным раствором лития метилата до получения синего окрашивания раствора. Тотчас прибавляют 0,200 г *кислоты бензойной РО,* перемешивают до растворения и титруют приготовленным раствором лития метилата до повторного получения синего окрашивания раствора. Во время титрования раствор защищают от атмосферного углерода диоксида. Титр раствора лития метилата устанавливают по объёму титранта, израсходованного в повторном титровании.

Титр устанавливают непосредственно перед использованием.

1 мл *0,1М раствора лития метилата* соответствует 12,21 мг$C_7H_60_2$.

0,1 M раствор магния хлорида. *3003400.*

20,33 г *магния хлорида Р* растворяют в *воде Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 1000.0 мл.

Установка титра. Проводят определение магния методом комплексометрии *(2.5.11).*

1 M щелочной раствор меди-этилендиамина. 3008700

Молярное отношение этилендиамина к меди состовляет 2,00±0,04.

0,02 M раствор меди сульфата. *3001200.*

5,0 г *меди (II) сульфата Р* растворяют в *воде Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 1000,0 мл.
Установка титра. К 20,0 мл приготовленного раствора меди сульфата прибавляют 2 г *натрия ацетата Р,* 0,1 *мл раствора пиридилазонафтола Р* и титруют *0,02 М раствором натрия эдетата* до перехода окраски от фиолетово-синей к ярко-зелёной. Вблизи точки эквивалентности титруют медленно.

0,1 M раствор натрия арсенита. *3005800.*

4,946 г *мышьяка (III) оксида РО,* в пересчёте на As_2O_3, растворяют в смеси 20 мл *раствора натрия гидроксида концентрированного Р* и 20 мл *воды Р,* доводят объём раствора *водой Р* до 400,0 мл и нейтрализуют *кислотой хлористоводородной разведенной Р по лакмусовой бумаге Р.* Растворяют в полученном растворе 2 г *натрия гидрокарбоната Р* и доводят объем раствора *водой Р* до 500,0 мл.

1 M раствор натрия гидроксида. *3006300.*

42 г *натрия гидроксида Р* растворяют в *воде, свободной от углерода диоксида, Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 1000,0 мл.

Установка титра. 20,0 мл приготовленного раствора натрия гидроксида титруют *1 М раствором кислоты хлористоводородной,* используя индикатор, указанный в методике количественного определения с использованием *1 М раствора натрия гидроксида.*

Если необходимо использование раствора натрия гидроксида, свободного от альдегидов, его готовят следующим образом. Растворяют *натрия гидроксид Р в воде Р* до получения раствора от 400 г/л до 600 г/л и отстаивают. Прозрачную жидкость над осадком сливают, защищая от воздействия углерода диоксида, разводят *водой, свободной от углерода диоксида, Р* до необходимой молярности. Раствор должен выдерживать следующее испытание. Титруют 20,0 мл раствора кислоты хлористоводородной той же молярности, что и приготовленный раствор натрия гидроксида, используя в качестве индикатора 0,5 мл раствора *фенолфталеина Р.* В точке эквивалентности прибавляют небольшое количество кислоты, необходимое для исчезновения розового окрашивания; концентрируют раствор до 20 мл кипячением; во время кипячения прибавляют кислоту в количестве, необходимом для исчезновения розового окрашивания, которое не должно возобновляться при длительном кипячении. Объём израсходованной кислоты не должен превышать 0,1 мл.

0,1 М раствор натрия гидроксида. *3006600.*

100,0 мл *1 М раствора натрия гидроксида* доводят *водой, свободной от углерода диоксида, Р* до объёма 1000,0 мл.

Установка титра. Проводят титрование, как указано для *1М раствора натрия гидроксида,* используя *0,1 М раствор кислоты хлористоводородной.*

0,1 М раствор натрия гидроксида этанольный. *3007000.*

К 250 мл *этанола Р* прибавляют 3,3 г *раствора натрия гидроксида концентрированного Р.*

Установка титра. 0,200 г *кислоты бензойной РО* растворяют в 2 мл *воды Р и* 10 мл *96% спирта Р* и титруют приготовленным раствором натрия гидроксида этанольным, используя в качестве индикатора 0,2 мл *раствора тимолфталеина Р.*

Титр устанавливают непосредственно перед использованием.

1 мл *0,1 М раствора натрия гидроксида этанольного* соответствует 12,21 мг $C_7H_6O_2$.

0,1 М раствор натрия метилата. *3007100.*

175 мл *метанола безводного Р* охлаждают в ледяной воде и прибавляют небольшими порциями около 2,5 г свеженарезанного *натрия Р;* когда металл растворится, доводят *толуолом Р до* объёма 1000,0 мл.

Установка титра. К 10 мл *диметилформамида Р* прибавляют 0,05 мл раствора 3 г/л *тимолового синего Р в метаноле Р и* титруют приготовленным раствором натрия метилата до синего окрашивания. Тотчас прибавляют 0,200 г *кислоты бензойной РО,* перемешивают до растворения и титруют приготовленным раствором натрия метилата до повторного получения синего окрашивания. Во время титрования раствор защищают от атмосферного углерода диоксида. Титр раствора натрия метилата устанавливают по объёму титранта, израсходованного в повторном титровании.

Титр устанавливают непосредственно перед использованием.

1 мл *0,1 М раствора натрия метилата* соответствует 12,21 мг $C_7H_6O_2$.

0,1 М раствор натрия нитрита. *3007200.*

7,5 г *натрия нитрита Р* растворяют в *воде Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 1000,0 мл.

Установка титра. 0,300 г *кислоты сульфаниловой РО* растворяют в 50 мл *кислоты хлористоводородной разведенной Р* и проводят определение первичной ароматической аминогруппы *(2.5.8)* электрометрически, используя приготовленный раствор натрия нитрита.

Титр устанавливают непосредственно перед использованием.

1 мл *0,1М раствора натрия нитрита* соответствует 17,32 мг $C_6H_7NO_3S$.

Установка титра. Около 0,200 г *сульфаниловой кислоты РО* помещают в толстостенный стакан, прибавляют 60 мл *воды Р*, 10 мл *кислоты хлористоводородной разведенной Р*, 1 г *калия бромида Р* и далее поступают, как описано в статье *«Определение аминного азота в соединениях, которые содержат первичную ароматическую аминогруппу» (2.5.8.).*

0,1 М раствор натрия перйодата. *3009500.*

21,4 г *натрия перйодата Р* растворяют в 500 мл *воды Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 1000,0 мл.

Установка титра. 20,0 мл приготовленного раствора натрия перйодата помещают в колбу с притёртой пробкой, прибавляют 5 мл *кислоты хлорной Р,* колбу закрывают пробкой и перемешивают. Доводят рН *(2.2.3)* до 6,4 *насыщенным раствором натрия гидрокарбоната Р.* Прибавляют 10 мл *раствора калия йодида Р,* закрывают пробкой, перемешивают, выдерживают 2 мин и титруют *0,025 М раствором натрия арсенита* до слабо-жёлтого окрашивания, затем прибавляют 2 мл *раствора крахмала Р* и титруют до обесцвечивания раствора.

0,1 М раствор натрия тиосульфата. *3007300.*

25 г *натрия тиосульфата Р* и 0,2 г *натрия карбоната Р* растворяют в *воде, свободной от углерода диоксида, Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 1000,0 мл.

Установка титра. К 10,0 мл *0,033 М раствора калия бромата* прибавляют 40 мл *воды Р,* 10 мл *раствора калия йодида Р,* 5 мл *кислоты хлористоводородной Р1* и титруют приготовленным раствором натрия тиосульфата, используя в качестве индикатора 1 мл *раствора крахмала Р,* прибавляемого в конце титрования.

0,1 М раствор натрия эдетата. *3005900.*

37,5 г *натрия эдетата Р* растворяют в 500 мл *воды Р,* прибавляют 100 мл *1 М раствора натрия гидроксида* и доводят объём раствора *водой Р* до1000,0 мл.

Установка титра. 0,120 г *цинка РО* растворяют в 4 мл *кислоты хлористоводородной Р1* и прибавляют 0,1 мл *бромной воды Р;* удаляют избыток брома кипячением, *прибавляют раствор натрия гидроксида разведенный Р* до слабокислой или нейтральной реакции и проводят количественное определение цинка методом комплексометрии *(2.5. 11).*

1 мл *0,1 М раствора натрия эдетата* соответствует 6,54 мг Zn.

Хранят в полиэтиленовом контейнере.

0,02 М раствор натрия эдетата. *3006000.*

7,444 г *натрия эдетата Р* растворяют в *воде Р* и доводят объем раствора тем же растворителем до 1000,0 мл.

Установка титра. 0,100 г *цинка РО* растворяют в 4 мл *кислоты хлористоводородной Р1* и прибавляют 0,1 мл *бромной воды Р;* удаляют избыток брома кипячением. Переносят раствор в мерную колбу и доводят объём раствора *водой Р до* 100,0 мл. 25,0 мл полученного раствора помещают в коническую колбу вместимостью 500 мл и доводят *водой Р* до объёма 200 мл. Прибавляют около 50 мг *индикаторной смеси ксиленолового оранжевого Р* и *гексаметилентетрамина Р* до

фиолетово-розового окрашивания. Прибавляют 2 г *гексаметилентетрамина Р* в избытке. Титруют приготовленным раствором натрия эдетата до перехода фиолетово-розового окрашивания в жёлтое.

1 мл *0,02 М раствора натрия эдетата* соответствует 1,308 мг Zn.

0,02 М раствор ртути нитрата. *3003500.*

6,85 г *ртути (II) нитрата Р* растворяют в 20 мл *1М раствора кислоты азотной* и доводят объём раствора *водой Р до* 1000,0 мл.

Установка титра. 15,0 мг *натрия хлорида РО* растворяют в 50 мл *воды Р* и титруют приготовленным раствором ртути нитрата потенциометрически *(2.2.20),* используя в качестве индикаторного электрода платиновый или ртутный, а в качестве электрода сравнения — сульфатртутный.

1 мл *0,02 М раствора ртути нитрата* соответствует 2,338 мг NaCl.

0,1 М раствор серебра нитрата. *3005600.*

17,0 г *серебра нитрата Р* растворяют в *воде Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 1000,0 мл.

Установка титра. 0,100 г *натрия хлорида РО* растворяют в 30,0 мл *воды Р* и титруют приготовленным раствором серебра нитрата потенциометрически *(2.2.20).*

1 мл *0,1 М раствора серебра нитрата* соответствует 5,844 мг NaCl.

 # Установка титра. Около 0,1500 г *натрия хлорида РО* растворяют в 50 мл *воды Р* и титруют приготовленным раствором серебра нитрата до появления красноватого осадка (индикатор – *калия хромат Р*).

1 мл *0,1 М раствора серебра нитрата* соответствует 5,844 мг NaCl.

Хранят в защищённом от света месте.

0,001 М раствор серебра нитрата. *3009300.*

5,0 мл *0,1 М раствора серебра нитрата* доводят *водой Р* до объема 500,0 мл.

0,5 М раствор серной кислоты. *3007800.*

28 мл *кислоты серной Р* смешивают с *водой Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 1000,0 мл.

Установка титра. 1,000 г *натрия карбоната РО* растворяют в 50 мл *воды Р,* прибавляют 0,1 мл *раствора метилового оранжевого Р* и титруют приготовленным раствором кислоты серной до красновато-жёлтого окрашивания. Кипятят около 2 мин; раствор снова приобретает жёлтое окрашивание, охлаждают и титруют вновь до повторного появления красновато-жёлтого окрашивания.

1 мл *0,5 М раствора кислоты серной* соответствует 53,00 мг Na_2CO_3.

0,05 М раствор серной кислоты. *3008000.*

100,0 мл *0,5 М раствора кислоты серной* доводят *водой Р* до объёма 1000,0 мл.

Установка титра. Определение проводят, как указано для *0,5 М раствора кислоты серной,* используя 0,100 г *натрия карбоната РО,* растворённого в 20 мл *воды Р.*

1 мл *0,05 М раствора кислоты серной* соответствует 5,30 мг Na_2CO_3.

0,1 М раствор свинца нитрата. *3003100.*

33 г *свинца нитрата Р* растворяют в *воде Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 1000,0мл.

Установка титра. К 20,0 мл приготовленного раствора свинца нитрата прибавляют 300 мл *воды Р* и проводят определение свинца методом комплексометрии *(2.5.11).*

0,1 М раствор тетрабутиламмония гидроксида. *3008300.*

40 г *тетрабутиламмония йодида Р* растворяют в 90 *мл метанола безводного Р,* прибавляют 20 г тонко измельченного *серебра оксида Р* и энергично встряхивают в течение 1 ч. Центрифугируют несколько миллилитров смеси и проводят испытание жидкости над осадком на йодиды. При получении положительной реакции дополнительно прибавляют 2 г *серебра оксида Р* и встряхивают в течение последующих 30 мин; эту процедуру повторяют до тех пор, пока жидкость не будет свободна от йодидов, смесь фильтруют через стеклянный фильтр и промывают реакционный сосуд и фильтр тремя порциями, по 50 мл каждая, *толуола Р.* К полученному фильтрату прибавляют промывной толуол и доводят *толуолом Р* до объёма 1000,0 мл. Через раствор пропускают сухой азот, свободный от углерода диоксида, в течение 5 мин.

Установка титра. К 10 мл *диметилформамида Р* прибавляют 0,05 мл раствора 3 г/л *тимолового синего Р в метаноле Р* и титруют приготовленным раствором тетрабутиламмония гидроксида до чистого синего окрашивания. Тотчас прибавляют 0,200 г *кислоты бензойной РО,* перемешивают до растворения и титруют приготовленным раствором тетрабутиламмония гидроксида снова до синего окрашивания. Титр раствора тетрабутиламмония гидроксида устанавливают по объёму титранта, израсходованного в повторном титровании.

Титр устанавливают непосредственно перед использованием.

1мл *0,1 М раствора тетрабутиламмония гидроксида* соответствует 12,21 мг $C_7H_6O_2$.

0,1 М раствор тетрабутиламмония гидроксида в 2-пропаноле. *3008400.*

Готовят, как указано для *0,1 М раствора тетрабутиламмония гидроксида,* используя в качестве растворителя *2-пропанол Р* вместо *толуола Р;* титр устанавливают, как указано для *0,1 М раствора тетрабутиламмония гидроксида.*

6 **М раствор хлористоводородной кислоты.** *3001500.*

618,0 *т кислоты хлористоводородной Р* доводят *водой Р до* объёма 1000,0 мл.

3 М раствор хлористоводородной кислоты. *3001600.*

309,0 г *кислоты хлористоводородной Р* доводят *водой Р* до объёма 1000,0 мл.

2М раствор хлористоводородной кислоты. *3001700.*

206,0 г *кислоты хлористоводородной Р* доводят вод*ой Р до* объёма 1000,0 мл.

1 М раствор хлористоводородной кислоты. *3001800.*

103,0 г *кислоты хлористоводородной Р* доводят вод*ой Р до* объёма 1000,0 мл.

Установка титра. 1,000 г *натрия карбоната РО* растворяют в 50 мл *воды Р,* прибавляют 0,1 мл *раствора метилового оранжевого Р* и титруют приготовленным раствором кислоты хлористоводородной до красновато-жёлтого окрашивания. Кипятят в течение 2 мин; раствор снова приобретает жёлтое окрашивание, охлаждают и продолжают титрование до красновато-жёлтого окрашивания.

1 мл *1 М раствора кислоты хлористоводородной* соответствует 53,00 мг Na_2C0_3.

0,1 М раствор хлористоводородной кислоты. *3002100.*

100,0 мл *1 М раствора кислоты хлористоводородной* доводят *водой Р* до объёма 1000,0 мл.

Установка титра. Проводят титрование, как указано для *1 М раствора кислоты хлористоводородной,* используя 0,100 г *натрия карбоната РО,* растворённого в 20 мл *воды Р.*

1 мл *0,1 М раствора кислоты хлористоводородной* соответствует 5,30 мг Na_2CO_3.

0,1 М раствор хлористоводородной кислоты в спирте. *3008800.*

9,0 мл *кислоты хлористоводородной Р* доводят *96% спиртом, свободным от альдегидов, Р* до объёма 1000,0 мл.

0,1 М раствор хлорной кислоты. *3003900.*

8,5 мл *кислоты хлорной Р* помещают в мерную колбу, содержащую около 900 мл *кислоты уксусной ледяной Р,* и перемешивают. Прибавляют 30 мл *уксусного ангидрида Р,* доводят объем раствора *кислотой уксусной ледяной Р* до 1000,0 мл, перемешивают и оставляют на 24 ч. Определяют содержание воды *(2.5.12)* без прибавления метанола и, если необходимо, доводят содержание воды от 0,1% до 0,2% прибавлением *уксусного ангидрида Р* или *воды Р.* Оставляют на 24 ч.

Установка титра. 0,350 г *калия гидрофталата РО* растворяют в 50 мл *кислоты уксусной безводной Р,* если необходимо, осторожно нагревая. Охлаждают, защищая от воздуха, и титруют приготовленным раствором кислоты хлорной, используя в качестве индикатора 0,05 мл *раствора кристаллического фиолетового Р.* Измеряют температуру раствора хлорной кислоты во время титрования. Если температура, при которой проводится количественное определение, отличается от температуры, при которой был установлен титр *0,1 М раствора кислоты хлорной,* тогда объем V_c), необходимый для количественного определения, вычисляют по формуле:

$$V_c = V \cdot [1+(t_1 - t_2) \cdot 0{,}0011],$$

где:
t_1 - температура, при которой устанавливают титр;
t_2 - температура, при которой проводят количественное определение;
V — объём, израсходованный на титрование фактически, в миллилитрах.

1 мл *0. 1 М раствора кислоты хлорной* соответствует 20.42 мг $C_8H_5KO_4$.

0,05 М раствор хлорной кислоты. *3004000.*

50,0 *мл 0,1 М раствора кислоты хлорной* доводят *кислотой уксусной безводной Р* до объёма 100,0 мл.

0,1 М раствор уксусной кислоты. *3008900.*

6,0 г *кислоты уксусной ледяной Р* доводят *водой Р* до объёма 1000,0 мл.

Установка титра. К 25,0 мл приготовленного раствора кислоты уксусной прибавляют 0,5 мл *раствора фенолфталеина Р* и титруют *0,1 М раствором натрия гидроксида.*

0,1 М раствор церия сульфата. *3001100.*

40,4 г *церия (IV) сульфата Р* растворяют в смеси 500 мл *воды Р* и 50 мл *кислоты серной Р;* охлаждают и доводят объём раствора *водой Р* до 1000,0 мл.

Установка титра. К 25,0 мл приготовленного раствора церия сульфата прибавляют 2,0 г *калия йодида Р,* 150 мл *воды Р* и тотчас титруют *0,1 М раствором натрия тиосульфата,* используя в качестве индикатора 1 мл *раствора крахмала Р.*

0,05 М раствор цинка хлорида. *3008500.*

6,82 г *цинка хлорида Р,* взвешенного с соответствующими предосторожностями, растворяют в *воде Р*. Если необходимо, по каплям прибавляют *кислоту*

хлористоводородную разведенную Р до исчезновения опалесценции и доводят объём раствора *водой Р* до 1000,0 мл.

Установка титра. К 20,0 мл приготовленного раствора цинка хлорида прибавляют 5 мл *кислоты уксусной разведенной Р* и проводят определение цинка методом комплексометрии *(2.5.11).*

0,1 М раствор цинка сульфата. *3008600.*

29 г *цинка сульфата Р* растворяют в *воде Р* и доводят объём раствора тем же растворителем до 1000,0 мл.

Установка титра. К 20,0 мл приготовленного раствора цинка сульфата прибавляют 5 мл *кислоты уксусной разведенной Р* и проводят определение цинка методом комплексометрии *(2.5.11).*

5.1 ОБЩИЕ ТЕКСТЫ ПО СТЕРИЛИЗАЦИИ

5.1.1. МЕТОДЫ ПРИГОТОВЛЕНИЯ СТЕРИЛЬНЫХ ПРОДУКТОВ

Под стерильностью понимают отсутствие жизнеспособных микроорганизмов. Стерильность продукции не может гарантироваться испытанием; она должна обеспечиваться производственным процессом, валидированным надлежащим образом. Важно, чтобы при изучении воздействия выбранной процедуры стерилизации на продукт (включая контейнер и упаковку) была подтверждена её эффективность, а также сохранение продукта. Рекомендуется выбирать такой контейнер, чтобы иметь возможность использовать оптимальный режим стерилизации. Малейшее нарушение валидированного процесса стерилизации влечет за собой риск получения нестерильного или некачественного продукта. Повторную валидацию следует проводить каждый раз при внесении изменений в процедуру стерилизации, в том числе при изменении объема продукта, стерилизуемого за один раз. При проектировании производственного процесса следует учитывать принципы надлежащей производственной практики (GMP) в том числе:

- привлечение квалифицированного персонала с соответствующей подготовкой;
- использование соответствующих помещений;
- использование соответствующего производственного оборудования, сконструированного таким образом, чтобы его можно было легко чистить и стерилизовать;
- применение соответствующих мер для сведения к минимуму биологических загрязнений до стерилизации;
- использование валидированных процедур на всех важнейших этапах производства;
- мониторинг производственной среды и процесса производства.

Предосторожности, необходимые для снижения биологической контаминации перед стерилизацией, включают использование компонентов с низкой степенью контаминации микроорганизмами. По отношению к составляющим, которые могут быть потенциально контаминированными в силу их происхождения, природы или способа подготовки, желательно применение микробиологического мониторинга и установление допустимых пределов микробного загрязнения.

Методы, описанные ниже, применимы главным образом к инактивации или удалению бактерий, дрожжей и плесневых грибов. Для биологической продукции животного или человеческого происхождения или в случаях, когда в производственном процессе участвовал такой материал, необходимо продемонстрировать во время валидации, что процесс способен удалить или инактивировать соответствующую вирусную контаминацию.

По возможности, следует выбирать процесс, при котором продукция стерилизуется в контейнере (конечная стерилизация). При использовании полностью валидированного метода конечной стерилизации – стерилизации паром, горячим воздухом или ионизирующим излучением по согласованию с соответствующим компетентным уполномоченным органом допускается параметрический выпуск серии стерильного продукта, при котором заключение о качестве серии принимается на основании данных о процессе стерилизации, а не результатов испытания на стерильность.

В тех случаях, когда конечная стерилизация невозможна, используют фильтрацию через фильтры, способные задержать бактерии, или производство в асептических условиях. По возможности при этом следует проводить дополнительную обработку продукта (например, нагревание) в контейнере. Во всех

случаях контейнер и укупорочное средство должны обеспечивать стерильность продукта на протяжении всего срока годности.

УРОВЕНЬ ГАРАНТИИ СТЕРИЛЬНОСТИ (STERILITY ASSURANCE LEVEL, SAL)

В тех случаях, когда это возможно, для методов, приведенных ниже, указывают “уровень гарантии стерильности” (SAL). Невозможно доказать, что стерильность достигнута для каждой единицы из множества единиц, подвергнутых стерилизации. Инактивация микроорганизмов физическими или химическими методами подчиняется экспоненциальному закону, следовательно, всегда существует конечная статистическая вероятность того, что микроорганизм может выжить в процессе стерилизации. Для каждого конкретного процесса вероятность выживания определяется количеством, типом и сопротивляемостью присутствующих микроорганизмов и средой, в которой находятся организмы во время обработки. SAL процесса стерилизации представляет собой степень гарантии того, что процесс, о котором идет речь, обеспечивает стерильность группы продукции. SAL конкретного процесса выражается как вероятность наличия нестерильного продукта в этой группе. Например, SAL=10^{-6} означает вероятность наличия не более одного жизнеспособного микроорганизма в 1 × 10^{6} стерилизованных единиц конечной продукции. SAL процесса стерилизации для конкретного продукта устанавливается в ходе надлежащего процесса валидации.

МЕТОДЫ И УСЛОВИЯ СТЕРИЛИЗАЦИИ

Стерилизация может быть проведена одним из описанных ниже методов. Возможно использование модификаций или комбинаций этих методов, при условии проведения валидации выбранной процедуры стерилизации как в отношении эффективности, так и в отношении целостности продукта, в том числе контейнера или упаковки. Для всех методов стерилизации ведется наблюдение за важнейшими стадиями процесса для того, чтобы подтвердить, что установленные ранее необходимые условия стерилизации выдерживаются для всей серии продукции на протяжении всего процесса стерилизации. Это применимо во всех случаях, включая случаи использования стандартных условий.

КОНЕЧНАЯ СТЕРИЛИЗАЦИЯ

При конечной стерилизации очень важно учитывать неоднородность физических и, где это уместно, химических условий внутри стерилизационной камеры. Для каждого варианта загрузки каждого типа и размера контейнера или упаковки следует определить положение в стерилизационной камере, которое наименее доступно для стерилизующего фактора (например, самое холодное место в автоклаве). Для подтверждения того, что все загрузки проходят определенную обработку равным образом, необходимо определить минимальную летальность микроорганизмов в ходе стерилизационного цикла и подтвердить воспроизводимость цикла.

После окончательного выбора режима конечной стерилизации необходимо, где это возможно, собирать сведения о качестве процесса в повседневном использовании при помощи мониторинга и ведения записей о физических и, если это уместно, химических условиях, полученных в камере при каждом стерилизационном цикле.

Паровая стерилизация (автоклавирование). Стерилизация насыщенным паром под давлением, где это возможно, в особенности для готовых лекарственных средств в виде водных растворов. Стандартные условия при таком методе конечной стерилизации готовых лекарственных средств в виде водных растворов следующие: прогревание при температуре не менее 121ºC в течение 15 мин (# 0,11 МПа (1,1

кгс/см^2) и температуре 120ºС; 0,20 МПа (2 кгс/см^2) и температуре 132ºС). Допускается использовать другие сочетаний времени и температуры, если предварительно доказано, что выбранный режим обеспечивает необходимый и воспроизводимый уровень летальности микроорганизмов в рамках установленных допусков. Используемые процедуры и меры предосторожности должны обеспечивать SAL не более 10^{-6}. Рекомендации по проведению валидации с использованием концентрации F_0 приведены ниже (*5.1.5*).

В ходе процесса стерилизации следует регистрировать физические условия (температура и давление) в автоклаве. Температуру, как правило, измеряют при помощи датчиков температуры, помещенных в контрольный контейнер. Дополнительные термоэлементы помещают в области загруженной камеры с наименьшей температурой (определенные предварительно). Условия в каждом цикле стерилизации должны соответствующим образом регистрироваться, например в виде температурно-временной диаграммы, или другим способом.

Если предусмотрена биологическая оценка, её проводят с использованием подходящих биологических индикаторов (*5.1.2).*

Стерилизация паром при температуре 120ºС рекомендуется для растворов лекарственных веществ (Табл. 5.1.1.-1). Время стерилизационной выдержки зависит от физико-химических свойств лекарственного средства, объема раствора и используемого оборудования:

Таблица 5.1.1.-1

Объем образца, мл	Минимальное время стерилизационной выдержки, мин
До 100	8
От 100 до 500	12
От 500 до 1000	15

Стерилизацию лекарственных средств в виде водных растворов проводят в герметично укупоренных, предварительно простерилизованных флаконах или ампулах.

Жиры и масла в герметично укупоренных сосудах рекомендуется стерилизовать при 120ºС в течение 2 ч.

Этим методом стерилизуются также изделия из стекла, фарфора, металла, перевязочные и вспомогательные материалы (вата, марля, бинты, фильтровальная бумага, пергамент, спецодежда и др.). Время стерилизационной выдержки при температуре 120ºС – 45 мин, при температуре 132ºС – 20 мин. Для стерилизации изделий из резины следует использовать первый из указанных режимов.

Стерилизацию перечисленных объектов проводят в стерильных коробах или в двухслойной упаковке из бязи, пергамента и др. В исключительных случаях допускается стерилизация при температуре ниже 120ºС. Конкретизация отдельных режимов применительно к определенному объекту стерилизации должна быть обоснована и указана в нормативной документации.

Сухожаровая стерилизация (стерилизация горячим воздухом). Для данного метода конечной стерилизации стандартными условиями являются: прогревание при температуре не менее 160°С в течение не менее 2 часов. Допускается использование других сочетаний времени и температуры, если предварительно доказано, что выбранный режим обеспечивает необходимый и воспроизводимый уровень летальности микроорганизмов в рамках установленных допусков. Используемые процедуры и меры предосторожности должны обеспечивать SAL не более 10^{-6}.

Сухожаровая стерилизация проводится в сухожаровом шкафу, оснащенном устройством для принудительной циркуляции воздуха, или при помощи другого оборудования, специально предназначенного для этой цели. Стерилизатор загружают таким образом, чтобы обеспечить однородность температуры в пределах

всей загрузки. Температуру, как правило, измеряют при помощи датчиков температуры, помещенных в контрольный контейнер. Дополнительные термоэлементы помещают в области загруженной камеры с наименьшей температурой (определенные предварительно). В ходе каждого цикла стерилизации регистрируют температуру подходящим способом.

Если предусмотрена биологическая оценка, её проводят с использованием подходящих биологических индикаторов (*5.1.2).*

Сухожаровая стерилизация при температуры более 220°С часто используются для стерилизации и депирогенизации изделий из стекла. В этом случае вместо использования биологических индикаторов должно быть доказано уменьшение на 3 порядка количество термостойких эндотоксинов (*5.1.2*).

Эффективность этого метода стерилизации зависит от температуры, времени, степени теплопроводности стерилизуемых объектов и правильности расположения их внутри стерилизационной камеры для обеспечения свободной циркуляции горячего воздуха.

Данный метод используют для стерилизации термостойких порошкообразных веществ натрия хлорида, окиси цинка, талька, белой глины и других (Табл. 5.1.1.-2.), или минеральных растительных масел, жиров, ланолина, вазелина, воска и других (Табл. 5.1.1.-3.).

Таблица 5.1.1.-2.

Масса образца, г	Температура, ºС	Минимальное время стерилизационной выдержки, мин
До 25	180 200	30 10
От 25 до 100	180 200	40 20
От 100 до 200	180 200	60 30

Таблица 5.1.1.-3.

Масса образца, г	Температура, ºС	Минимальное время стерилизационной выдержки, мин
До 100	180 200	30 15
От 100 до 500	180 200	40 20

Изделия из стекла, металла, силиконовой резины, фарфора, установки для стерилизующего фильтрования с фильтрами и приемники фильтрата стерилизуются при 180°С в течение 60 мин или при 160°С в течение 2,5 ч. Допускается использование более высоких температур нагрева при соответствующем уменьшении времени стерилизационной выдержки, обеспечивающих стерильность и сохранность объекта. Режим должен быть обоснован и указан в нормативной документации.

Радиационная стерилизация. Стерилизация этим методом достигается при помощи воздействия на продукт ионизирующего излучения в форме гамма-излучения от соответствующего радиоизотопного источника (такого как кобальт-60) или пучка электронов, подаваемого соответствующим ускорителем электронов.

В некоторых странах существуют распоряжения, регламентирующие использование ионизирующего излучения для стерилизации, например, в соответствующих Руководящих указаниях Европейского Сообщества.

Для этого метода конечной стерилизации стандартная поглощенная доза составляет 25 кГр. Допускается использовать другие дозы, если предварительно доказано, что выбранный режим обеспечивает необходимый и воспроизводимый уровень летальности микроорганизмов в рамках установленных допусков. Используемые процедуры и меры предосторожности должны обеспечивать SAL не более 10^{-6}.

В процессе стерилизации следует постоянно осуществлять измерения поглощенного продуктом излучения при помощи установленных дозиметрических методов, не зависящих от доз. Дозиметры должны проходить калибровку по отношению к стандартному источнику на эталонной радиационной установке непосредственно после получения от поставщика, а затем через определенные промежутки времени продолжительностью не более одного года.

Если предусмотрена биологическая оценка, её проводят с использованием подходящих биологических индикаторов (*5.1.2).*

Газовая стерилизация. Этот метод стерилизации может использоваться, только в случае, если нет подходящей альтернативы. При этом должно быть обеспечено проникновение газа и влаги в стерилизуемый продукт, а так же последующее удаление газа способом, позволяющим снизить концентрацию газа и продуктов его превращения в стерилизуемом продукте до уровня, не вызывающего токсических эффектов при использовании продукта. Соответствующие рекомендации относительно использования этиленоксида приводится, например, приводятся в Руководящих указаниях Европейского Сообщества.

Там, где это возможно, необходимо в ходе стерилизации вести измерение и регистрацию концентрации газа, относительной влажности, температуры и продолжительности процесса. Измерения проводятся там, где наименее вероятно достижение условий стерилизации, как установлено при валидации.

Эффективность процесса для каждой загрузки проверяется с помощью использования подходящего биологического индикатора (*5.1.2*).

Перед выпуском каждой серии необходимо проводить контроль стерильности на соответствующем количестве образцов (*2.6.1*).

Проведение данного вида стерилизации возможно в следующих условиях:

- окись этилена – стерилизующая доза 1200 мг/дм^3, температура стерилизации не менее 18°С, относительная влажность 80%, время стерилизационной выдержки – 16 ч (портативный аппарат);

- смесь ОБ (смеси окиси этилена и бромистого метила в весовом соотношении (1 : 2,5):

а) стерилизующая доза 2000 мг/дм^3, температура стерилизации 55°С, относительная влажность 80%, время стерилизационной выдержки – 4 ч;

б) стерилизующая доза 2000 мг/дм^3, температура стерилизации не менее 18°С, относительная влажность 80%, время стерилизационной выдержки – 16 ч при той же относительной влажности (портативный аппарат).

Допускается использование других режимов газовой стерилизации, обеспечивающих стерильность и сохранность объекта. Режим должен быть обоснован и указан в нормативной документации.

Стерилизуемые изделия упаковываются в пакеты из полиэтиленовой пленки толщиной от 0,06 до 0,2 мм, пергамента и др. Метод рекомендован для изделий из резины, полимерных материалов, стекла, металла.

В связи с токсичностью окиси этилена и бромистого метила применение стерилизованных этими газами изделий допускается только после их дегазации, т.е. выдержки в вентилируемом помещении до допустимых остаточных количеств, указанных в нормативной документации.

Условия дегазации зависят от назначения, способа применения, размеров изделий и упаковки и указываются в нормативной документации на изделие.

ФИЛЬТРАЦИЯ

Некоторые активные ингредиенты и продукты, которые не подлежат конечной стерилизации, могут быть подвергнуты процедуре фильтрации через фильтры, пригодность которых предварительно доказана путем микробиологических испытаний с использованием подходящих тест-микроорганизмов, например, *Pseudomonas diminuta* (ATCC 19146, NCIMB 11091, CIP 103020, # CCM 4623). При испытании рекомендуется использовать концентрацию микроорганизмов не менее 10^7 КОЭ/$см^2$ активной поверхности фильтра и приготовление суспензии в триптон-соевом бульоне, который после прохождения через фильтр собирается асептическим способом и инкубируется аэробно при температуре 32°С. Такая процедура требует соблюдения мер предосторожности. Организация производственного процесса и состояние окружающей среды должны сводить к минимуму риск микробного загрязнения, их следует регулярно подвергать надлежащему мониторингу. Оборудование, контейнеры, укупорочные средства и, где это возможно, ингредиенты должны подвергаться надлежащей стерилизации. Рекомендуется проводить процесс фильтрации непосредственно перед стадией наполнения контейнера. Операции, которые следуют за стадией фильтрации, необходимо проводить в асептических условиях.

Растворы пропускают через мембранные фильтры (с номинальным размером пор не более 0,22 мкм), способные задерживать бактерии, или через фильтры других типов, не уступающие им по эффективности. Необходимо предпринимать надлежащие меры для предотвращения потерь растворенного вещества в результате адсорбции на фильтре, а также высвобождения удержанных фильтром загрязнений. Следует учитывать уровень биозагрязнений до начала фильтрации, пропускную способность фильтра, объем серии и продолжительность фильтрации. Фильтр не должен использоваться в течение более длительного времени, чем утверждено при валидации данного фильтра в сочетании с конкретным фильтруемым лекарственным средством.

Целостность собранного стерилизующего фильтра должна проверяться перед использованием и подтверждаться после использования путем проведения испытаний, соответствующих типу используемого фильтра и этапу испытания, например, испытания на определение насыщения, удержание давления или скорости диффузии.

Так как метод стерилизующей фильтрации имеет дополнительные потенциальные факторы риска по сравнению с другими процессами стерилизации, рекомендуется проводить предварительную фильтрацию через удерживающие бактерии фильтр в тех случаях, когда низкий уровень биозагрязнений не может быть обеспечен другими средствами.

ПРОИЗВОДСТВО В АСЕПТИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ

Целью производства в асептических условиях является сохранение стерильности продукта, изготовленного из компонентов, каждый из которых был предварительно простерилизован одним из методов, описанных выше. Это достигается путем использования условий и оборудования, предназначенных для предотвращения микробного загрязнения. В асептических условиях могут осуществляться такие стадии производственного процесса, как наполнение контейнеров и укупорка, смешивание ингредиентов с последующим асептическим наполнением и асептической укупоркой.

Для сохранение стерильности компонентов состава и готового лекарственного средства в ходе производственного процесса особое внимание следует уделять:
- состоянию производственной среды;

- персоналу;
- критическим поверхностям;
- стерилизации контейнеров/укупорочных средств и передаточным процедурам;
- предельному времени хранения лекарственного средства до наполнения контейнера.

Валидация процесса включает надлежащую проверку всего вышеперечисленного, а также систематический контроль при помощи имитационных испытаний с использованием питательной среды, которую инкубируют и исследуют на наличие микробного загрязнения (испытания на заполнение питательными средами). Кроме того, перед выпуском серии любого лекарственного средства, простерилизованного методом фильтрации/или изготовленного в асептических условиях, следует проводить испытание на стерильность для соответствующего количества образцов (*2.6.1*).

5.1.2. БИОЛОГИЧЕСКИЕ ИНДИКАТОРЫ СТЕРИЛИЗАЦИИ

Биологические индикаторы представляют собой стандартизованные препараты определенных микроорганизмов, используемые для оценки эффективности процедуры стерилизации. Они обычно представляют собой популяцию спор бактерий, нанесенных на инертный носитель, например, на полоску фильтровальной бумаги, стеклянную пластинку или пластиковую пробирку. Инокулированный носитель изолируют таким образом, чтобы предотвратить его повреждение или загрязнение, но в то же время обеспечить контакт стерилизующего агента с микроорганизмами. Суспензии спор могут находиться в герметично закрытых ампулах. Биологические индикаторы готовят таким образом, чтобы существовала возможность их хранения при определенных условиях, при этом должен быть указан срок годности.

Микроорганизмы того же вида, что и бактерии, используемые в производстве биологических индикаторов, могут инокулироваться непосредственно в жидкий продукт, предназначенный для стерилизации, или в жидкий продукт, аналогичный тому, который предназначен для стерилизации. В этом случае необходимо доказать, что жидкий продукт не оказывает ингибирующего воздействия на используемые споры, особенно на их прорастание.

Биологический индикатор должен иметь следующие характеристики: название вида бактерий, используемых в качестве эталонных микроорганизмов, номер штамма в исходной коллекции, количество жизнеспособных спор, приходящееся на носитель, и величину D. Величина D - параметр стерилизации (продолжительность или поглощенная доза), обеспечивающий снижение числа жизнеспособных микроорганизмов до 10% от исходного числа. Данная величина имеет смысл для точно определенных экспериментальных условий стерилизации. Биологический индикатор может содержать несколько видов бактерии на одном носителе. Должна быть указана информация о необходимой питательной среде и условиях инкубации.

Индикаторы рекомендуется размещать в областях, наименее доступных для стерилизующего агента. Эти области определяют эмпирически или на основании предварительных физических измерений, если это возможно. Можно использовать биологические индикаторы, которые включают ампулу с питательной средой, помещенную в упаковку, защищающую инокулированный носитель.

Выбор тест-микроорганизмов для биологических индикаторов должен проводиться с учетом следующих требований:
(а) сопротивляемость тест-штамма конкретному методу стерилизации должна быть высокой по сравнению с сопротивляемостью всех патогенных микроорганизмов и сопротивляемостью микроорганизмов, потенциально контаминирующих продукт;
(б) тест-штамм не должен быть патогенным;
(в) тест-штамм должен легко культивировать.

Наличие после инкубации роста эталонных микроорганизмов, подвергшихся процедуре стерилизации, говорит о том, что эта процедура неудовлетворительна.

Паровая стерилизация. Для валидации циклов стерилизации рекомендуется использование биологических индикаторов, предназначенных для стерилизации паром. Рекомендуются споры *Bacillus stearothermophilus* (например, ATCC 7953, NCTC 10007, NCIMB 8157 или CIP 52.81). Число жизнеспособных спор должно превышать $5 \cdot 10^5$ на носитель. Величина D при температуре 121°C должна составлять более 1,5 мин. При обработке биологических индикаторов паром при температуре (121±1)°C в течение 6 мин должно наблюдаться сохранение жизнеспособных спор, а обработка при той же температуре в течение 15 мин должна приводить к полной гибели эталонных тест-микроорганизмов.

Сухожаровая стерилизация. Для приготовления биологических индикаторов рекомендованы споры *Bacillus subtilis* (например, var. niger ATCC 9372, NCIMB 8058 или CIP 77.18). Число жизнеспособных спор должно быть более $1 \cdot 10^5$ на носитель. Величина D при температуре 160°C должна составлять 1-3 мин. Для стерилизации и депирогенизации стеклянной посуды часто используется горячий воздух при температуре более 220°C. В этом случае в качестве замены биологическим индикаторам может быть доказано снижение термостойких бактериальных эндотоксинов на три порядка.

Радиационная стерилизация. Биологические индикаторы могут применяться для мониторинга текущих операций в качестве дополнительной возможности оценки эффективности установленной дозы излучения, особенно в случае стерилизации ускоренными электронами. Рекомендуются споры *Bacillus pumilus* (например, ATCC 27.142, NCTC 10327, NCIMB 10692 или CIP 77.25). Число жизнеспособных спор должно быть более $1 \cdot 10^7$ на носитель. Величина D должна составлять более 1,9 кГр. Необходимо убедиться, что после облучения биологического индикатора дозой 25 кГр (минимальная поглощенная доза), не наблюдается роста эталонных микроорганизмов.

Газовая стерилизация. Для всех процедур газовой стерилизации необходимо использование биологических индикаторов: как для валидации циклов, так и для каждодневной работы. Число жизнеспособных спор должно быть более $5 \cdot 10^5$ на носитель. Для этиленоксида и формальдегида рекомендуется использовать споры *Bacillus subtilis* (например, var. niger ATCC 9372, NCIMB 8058 или CIP 77.18), # перекиси водорода и перуксусной кислоты - споры *Bacillus stearothermophilus* (например, ATCC 7953, NCTC 10007, NCIMB 8157 CIP 52.81). Для каждой конкретной процедуры должны быть известны параметры сопротивляемости тест-микроорганизма: например, для этиленоксида величина D должна составлять более 2,5 мин для цикла стерилизации со следующими параметрами: концентрация окиси этилена 600 мг/л, температура 54°C и относительная влажность 60%. Следует убедиться, что после 60-минутного цикла стерилизации с указанными параметрами не наблюдается рост эталонных микроорганизмов, тогда как после 15-минутного цикла при более низкой температуре (600 мг/л, 30ºC, 60%) жизнеспособность спор сохраняется. Важно, чтобы биологические индикаторы позволяли выявить недостаточную влажность в стерилизаторе и продукте, чтобы гарантировать инактивацию обезвоженных микроорганизмов. Жизнеспособность спор должна сохранятся при воздействии на индикатор окиси этилена (600 мг/л, 54°C, 60 мин) без увлажнения.

5.1.3. ЭФФЕКТИВНОСТЬ АНТИМИКРОБНЫХ КОНСЕРВАНТОВ

Если лекарственное средство само по себе не обладает антимикробной активностью, в его состав могут быть введены антимикробные консерванты, в особенности в готовые лекарственные средства в виде водных растворов для предотвращения размножения или ограничения контаминации микроорганизмами, которая может произойти с продуктами при нормальных условиях хранения и использования, особенно с контейнерами на большое количество доз, и представлять опасность для пациента. Антимикробные консерванты не должны

применяться в качестве альтернативы надлежащей производственной практики (GMP).

Эффективность антимикробных консервантов может усиливаться или ослабляться в результате взаимодействия с действующим веществом или другими компонентами готового лекарственного средства, а также с упаковочными или укупорочными материалами. Поэтому на протяжение срока годности следует контролировать антимикробную активность готового лекарственного средства, хранящегося в контейнере, с целью доказательства того, что она не снижается в процессе хранения. Такие исследования должны проводиться на образцах, извлеченных из контейнера непосредственно перед испытанием.

На стадии разработки лекарственного средства необходимо доказать, что антимикробная активность самого лекарственного средства или при необходимости лекарственного средства с консервантом обеспечивает надлежащую защиту от нежелательного воздействия, которые могут быть результатом микробного загрязнения лекарственного средства или размножения в нем микроорганизмов в процессе хранения или использования.

Эффективность антимикробной активности может быть продемонстрирована при помощи приведенного ниже испытания. Данное испытание не предназначено для использования в целях повседневного контроля.

ИСПЫТАНИЕ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ АНТИМИКРОБНЫХ КОНСЕРВАНТОВ

Испытание состоит во внесении в готовое лекарственное средство по возможности находящееся в контейнере, количества подходящих микроорганизмов и хранении инокулированного образца при указанной ниже температуре, извлечении проб из инокулированных образцов через определенный промежуток времени и определении в нем числа микроорганизмов.

Эффективность консерванта в готовом лекарственном средстве считают удовлетворительной, если в условиях проведения испытаний, при хранении инокулированнных образцов при заданной температуре, в течение указанных промежутков времени наблюдается значительное уменьшение числа микроорганизмов. Критерии оценки, показывающие уменьшение числа микроорганизмов за определенный период времени, зависят от требуемой степени защиты готового лекарственного средства (см. Таблице 5.1.3.-1/2/3).

Тест-микроорганизмы

Aspergillus niger	IMI 149 007 (ATCC 16404, IP 1431.83) # ВКМF-1119, # ВКПМ F-824
Candida albicans	NCPF 3179 (ATCC 10231, IP 48.72) # АТСС-885-653
Pseudomonas aeruginosa	NCIMB 8626 (ATCC 9027, CIP 82.118) # ГИСК 453
Staphylococcus aureus	NCTC 10788 (NCIMB 9518, ATCC 6538, CIP 4.83) # АТСС 6538-Р (FDA 209-Р)

Необходимо применять один штамм бактерий, выбранные микроорганизмы могут дополняться другими штаммами или видами, которые могут представлять вероятное микробное загрязнение для лекарственного средства. Например, *Escherichia coli* [NCIMB 8545 (ATCC 8739, CIP 53.126, # ATCC 25922)] используется при испытании всех лекарственных средств для орального применения, а *Zygosaccharomyces rouxii* [NCYC 381 (IP 2021.92)] - для лекарственных средств для орального применения с высокой концентрацией сахара.

Подготовка посевного материала

Для подготовки к испытанию свежевыращенную исходную культуру каждого микроорганизма из указанных тест-микробов пересевают на поверхность плотной питательной среды В (*2.6.12*) в случае выращивания бактерий или плотной питательной среды С без добавления антибиотиков (*2.6.12*) в случае выращивания грибов. Культуры бактерий инкубируют при температуре 30-35°С в течение 18-24 ч; культуру *Candida albicans* инкубируют при температуре 20-25°С в течение 48 ч и культуру *Aspergillus niger* - при температуре 20-25°С в течение 7 дней до получения хорошо развитых спор. Для получения чистой культуры микроорганизмов могут потребоваться пересевы, однако рекомендуется ограничиться их минимально возможным числом.

Для приготовления суспензии бактериальных культур и культуры *Candida albicans* микробную массу смывают с питательной среды стерильной суспендирующей жидкостью, содержащей 9 г/л *натрия хлорида Р* и 0,1 г/л *пептона Р*, и переносят в подходящий сосуд. Затем с помощью той же жидкости доводят содержание микроорганизмов до 10^8 в миллилитре. Для приготовления суспензии для рассеивания и переноса поверхностного роста в подходящий сосуд. Добавляют культуры *Aspergillus niger* используют стерильную суспендирующую жидкость, содержащую 0,9 г/л *хлорида натрия Р* и 0,5 г/л *полисорбата 80 Р,* и с ее помощью доводят содержание спор до приблизительно 10^8 в одном миллилитре.

Из каждой суспензии немедленно отбирают подходящий образец и определяют число колониеобразующих единиц в 1 мл (КОЭ/мл) каждой суспензии методом прямого посева на чашки или методом мембранной фильтрации (*2.6.12*). Полученное значение служит для определения числа жизнеспособных микроорганизмов в инокуляте и сходного числа микроорганизмов при проведении испытания. Инокулят следует использовать немедленно после приготовления.

МЕТОДИКА

Для подсчета жизнеспособных микроорганизмов в инокулированных образцах используют ту же плотную питательную среду, которая была использована для первоначального выращивания соответствующих микроорганизмов.

Необходимо инокулировать каждый из контейнеров с испытуемым лекарственным средством суспензией одного из тест-микроорганизмов до концентрации 10^5-10^6 КОЭ в 1 мл или 1 г лекарственного средства. Объем суспензии должен составлять не более 1% от объема образца. Образец тщательно перемешивают для обеспечения равномерного распределения микроорганизмов.

Инокулированные образцы лекарственного средства выдерживают при температуре 20-25°С в защищенном от света месте. Из каждого испытуемого образца отбирают пробы (обычно 1 мл или 1 г) непосредственно после инокуляции и через указанные интервалы времени (см. Таблицы 5.1.3-1/2/3) определяют число жизнеспособных микроорганизмов методом посева на чашки или методом мембранной фильтрации (*2.6.12*). Антимикробную активность готового лекарственного средства следует устранить путем разведения, фильтрации или с помощью подходящего инактиватора. При использовании инактиватора следует подтвердить путем контрольных опытов, что его присутствие не влияет на жизнеспособность микроорганизмов. Следует подтвердить пригодность методики для доказательства требуемого снижения числа жизнеспособных микроорганизмов.

КРИТЕРИИ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ АНТИМИКРОБНЫХ КОНСЕРВАНТОВ

Критерии оценки антимикробной активности приведены в Таблице 5.1.3.-1/2/3 в виде логарифма уменьшения числа жизнеспособных микроорганизмов.

Таблица 5.1.3.-1. – *Лекарственные средства для парентерального и офтальмологического применения*

		Lg уменьшения				
		6 часов	**24 часа**	**7 сут**	**14 сут**	**28 сут**
Бактерии	A	2	3	-	-	НВ*
	B	-	1	3	-	НУ**
Грибы	A	-	-	2	-	НУ
	B	-	-	-	1	НУ

* НВ: нет выявления
** НУ: нет увеличения

Критерий А соответствует рекомендованной эффективности. Если обосновано, что критерий А не может быть достигнут, например, по причине повышенного риска неблагоприятных воздействий, лекарственное средство должно удовлетворять критерию В.

Таблица 5.1.3.-2. – *Лекарственные средства для местного применения*

		Lg уменьшения			
		2 сут	**7 сут**	**14 сут**	**28 сут**
Бактерии	A	2	3	-	НУ
	B	-	-	3	НУ
Грибы	A	-	-	2	НУ
	B	-	-	1	НУ

Критерий А соответствуют рекомендованной эффективности. Если обосновано, что критерий А не может быть достигнут, например, по причине повышенного риска неблагоприятных воздействий, лекарственное средство должно удовлетворять критерию В.

Таблица 5.1.3.-3.- *Лекарственные средства для орального применения*

	Lg уменьшения	
	14 сут	**28 сут**
Бактерии	3	НУ
Грибы	1	НУ

Приведенный критерий соответствуют рекомендованной эффективности.

5.1.4. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ЧИСТОТА ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

При производстве, упаковке, хранении и продвижении готовых лекарственных средств должны быть приняты соответствующие меры для обеспечения их микробиологической чистоты. К готовым лекарственным средствам рекомендуется предъявлять требования, приведенные ниже.

Категория 1

Готовые лекарственные средства, к которым предъявляется требование по стерильности, применяемые в дозированной форме и другие готовые лекарственные средства, маркированные как стерильные.

- Должны выдерживать испытание на стерильность (*2.6.1*).

Категория 2

Готовые лекарственные средства для местного применения и ингаляционного применения, за исключением тех, к которым предъявляются требования по стерильности, и трансдермальные пластыри.

- Общее число аэробных бактерий и грибов (суммарно) не более 10^2 в 1 г, в 1 мл или на 1 пластырь (включая клеевую основу и подложку), (*2.6.12*).
- Трансдермальные пластыри: отсутствие энтеробактерий и других грамотрицательных бактерий на 1 пластыре (включая клеевую основу и подложку), (*2.6.13*). Другие готовые лекарственные средства: не более 10^1 энтеробактерий и других грамотрицательных бактерий в 1 г или в 1 мл (*2.6.13*).
- Отсутствие *Pseudomonas aeruginosa* в 1 г, в 1 мл или на 1 пластырь (включая клеевую основу и подложку (*2.6.13*).
- Отсутствие *Staphylococcus aureus* в 1 г, в 1 мл или на 1 пластырь (включая клеевую основу и подложку) (*2.6.13*).

Категория 3

А. *Готовые лекарственные средства для орального применения и ректального введения.*
- Общее число аэробных бактерий не более 10^3 и не более 10^2 грибов в 1 г или 1 мл (*2.6.12*).
- Отсутствие *Escherichia coli* в 1 г или в 1мл (*2.6.13*).

Б. *Готовые лекарственные средства для орального применения, в состав которых входят субстанции и вспомогательные вещества природного (животного, растительного или минерального) происхождения, для которых предварительная антимикробная обработка невозможна и в отношении которых компетентный уполномоченный орган допускает антимикробной загрязнение не более 10^3 жизнеспособных микроорганизмов в 1 г или в 1 мл. Исключением являются растительные лекарственные средства, относящиеся к Категории 4.*
- Общее число аэробных микроорганизмов не более 10^4 и не более 10^2 грибов в 1 г или в 1 мл (*2.6.12*).
- Энтеробактерий и других грамотрицательных бактерий не более 10^2 в 1 г или в 1 мл (*2.6.13*).
- Отсутствие *Salmonella* в 10 г или в 10 мл (*2.6.13*).
- Отсутствие *Escherichia coli* в 1 г или в 1 мл (*2.6.13*).
- Отсутствие *Staphylococcus aureus* в 1 г или в 1 мл (*2.6.13*).

Категория 4

Лекарственные средства, состоящие только из растительных компонентов одного или нескольких (цельных, измельченных или порошкообразных).

А. *Растительные лекарственные средства, к которым перед употреблением прибавляют кипящую воду.*

- Общее число аэробных микроорганизмов не более 10^7 и грибов не более 10^5 в 1 г или в 1 мл (*2.6.12*).
- *Escherichia coli* не более 10^2 в 1 г или в 1 мл (*2.6.13*), используя подходящее разбавление.

Б. *Растительные лекарственные средства, к которых перед употреблением не прибавляют кипящую воду.*

- Общее число аэробных микроорганизмов не более 10^5 и грибов не более 10^4 в 1 г или в 1 мл (*2.6.12*).
- Энтеробактерий и других грамотрицательных бактерий не более 10^3 в 1 г или 1 мл (*2.6.13*).
- Отсутствие *Escherichia coli* в 1 г или в 1 мл (*2.6.13*).
- Отсутствие *Salmonella* в 10 г или в 10 мл (*2.6.13*).

 # Микробиологическая чистота субстанций и вспомогательных материалов, используемых при производстве лекарственных препаратов.

Категория 1.2

Субстанции и вспомогательные вещества для производства:

§ *Стерильных лекарственных средств.*

§ *Нестерильных лекарственных средств, относящихся к Категории 2.*

- Общее число аэробных бактерий и грибов (суммарно) не более 10^2 в 1 г или в 1 мл.
- Отсутствие бактерий семейства *Enterobacteriaceae* в 1 г или в 1 мл.
- Отсутствие *Pseudomonas aeruginosa* в 1 г или в 1 мл.
- Отсутствие *Staphylococcus aureus* в 1 г или в 1 мл.

Категория 2.2

§ *Субстанции синтетического происхождения для производства нестерильных лекарственных* средств.

§ *Вспомогательные вещества (мука пшеничная, крахмал, тальк и т.д.)*

- Общее число аэробных бактерий не более 10^3 и грибов не более 10^2 в 1 г или в 1 мл.
- Отсутствие *Escherichia coli* в 1 г или в 1 мл.

В случае использования субстанции для производства готового лекарственного средства, в котором лимитируется содержание *Salmonella, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus,* энтеробактерий, к данной субстанции должны предъявляться следующие дополнительные требования:

- Отсутствие *Salmonella* в 10 г или в 10 мл.
- Отсутствие *Pseudomonas aeruginosa* в 1 г или в 1 мл.
- Отсутствие *Staphylococcus aureus* в 1 г или в 1 мл.
- Энтеробактерий - не более 10^2 в 1 г или в 1 мл.

Категория 3.2

Субстанции природного происхождения (растительного, животного или минерального).

- Общее число аэробных бактерий не более 10^4 и грибов не более 10^2 в 1 г или в 1 мл.
- Отсутствие *Escherichia coli* в 1 г или в 1 мл.
- Отсутствие *Salmonella* в 10 г или в 10 мл.
- Отсутствие *Pseudomonas aeruginosa* в 1 г или в 1 мл.
- Отсутствие *Staphylococcus aureus* в 1 г или в 1 мл.
- Энтеробактерий - не более 10^2 в 1 г или в 1 мл.

5.1.5 .ПРИМЕНЕНИЕ F_0 КОНЦЕПЦИИ ПРИ СТЕРИЛИЗАЦИИ ПАРОМ ВОДНЫХ РАСТВОРОВ.

Настоящий раздел носит справочный характер.

Значение F_0 насыщенного пара в процессе стерилизации – это поражающее действие, выраженное в терминах, эквивалентных времени в минутах при температуре 121°С, относящееся к процессу производства на его конечной стадии в сравнении с микроорганизмами, имеющими величину Z равную 10.

Общее значение F_0 процесса, включающего стадию нагревания и остывания, может быть рассчитано объединением смертельных норм относительно времени в дискретных температурных интервалах.

Если процесс паровой стерилизации выбран на основе F_0 концепции, большое внимание должно быть уделено тому, чтобы полная стерилизация была постепенно достигнута. В дополнение к валидации процесса, необходимо проведение непрерывного строгого микробиологического контроля в ходе всего процесса, чтобы доказать, что микробиологические параметры находятся в допустимых пределах не более SAL 10^{-6}.

По отношению к паровой стерилизации величина Z – это величина, связывающая термостойкость микроорганизмов к изменению температуры. Величина Z – это изменение температуры, необходимое для изменения величины D на 10. Величина D - параметр стерилизации (продолжительность или поглощенная доза), обеспечивающий снижение числа жизнеспособных микроорганизмов до 10% от исходного числа. Это величина, определенная при точных экспериментальных условиях.

Для расчетов применяется следующее математическое выражение:

$$F_0 = D_{121}(\log N_0 - \log N) = D_{121}\log IF,$$

где D_{121} – величина D стандартных спор (Приложение 1) при температуре 121°С;
N_0 – начальное число жизнеспособных бактерий;
N – конечное число жизнеспособных бактерий;
IF – коэффициент инактивации.

$$Z = (T_2-T_1)/\log D_1 - \log D_2),$$

где D_1 – величина D микроорганизмов при температуре T_1.
D_2 - величина D микроорганизмов при температуре T_2.

$$IF = N_0 - N = 10^{t/D},$$

где t - время экспозиции;
D - величина D микроорганизмов в условиях экспозиции.

5.2. ОБЩАЯ ИНФОРМАЦИЯ О ВАКЦИНАХ

5.2.1. ОБЩЕПРИНЯТАЯ ТЕРМИНОЛОГИЯ

В некоторых пунктах настоящей статьи в скобках приведены альтернативные термины, которые обычно используются по отношению к ветеринарным вакцинам.

Эталонный банк культур микроорганизмов. Эталонный банк культур микроорганизмов представляет собой систему, согласно которой последовательные партии продукции производятся из одного и того же контрольного банка культур микроорганизмов, при этом происхождение и история цикла изменений контрольных посевов и семян и рабочего банка культур клеток записываются.

Контрольный банк культур микроорганизмов. Культура микроорганизма, размещенная из общей массы по контейнерам, которые обрабатываются вместе в рамках одной операции таким образом, чтобы обеспечить единообразие и стабильность и предотвратить контаминацию. Контрольный банк культур микроорганизмов в жидком виде хранится обычно при температуре не выше – 70 °С. Лиофильно высушенный контрольный банк культур микроорганизмов хранится при температуре, обеспечивающей стабильность.

Рабочий банк культур микроорганизмов. Культура микроорганизма, полученная из контрольного банка культур микроорганизмов и предназначенная для использования в производстве. Рабочий банк культур микроорганизмов помещают в контейнеры и хранят, как описано выше для контрольного банка культур микроорганизмов.

Система банков клеток (система посевов клеток). Национальная коллекция перевиваемых линий и диплоидных штаммов клеток человека и животных, основной функцией которой является ведение, сбор, характеристика (аттестация), сохранение эталонных культур клеток (криобанк, - 196 °С).

Контрольный банк культур клеток. Клеточная культура, размещенная из общей массы по контейнерам в рамках одной операции, которые обрабатываются вместе и хранятся таким образом, чтобы обеспечить единообразие и стабильность и предотвратить контаминацию. Контрольный банк культур клеток хранится обычно при температуре не выше – 70 °С.

Рабочий банк культур клеток. Клеточная культура, полученная из контрольного банка и используемая в производстве перевиваемых линий клеток. Рабочий банк культур микроорганизмов помещаются в контейнеры и хранят, как описано выше для контрольного банка культур микроорганизмов.

Исходные клеточные культуры. Диплоидные линии или штаммы культур клеток, сохраняющие исходные свойства ткани, из которой они получены.

Культура клеток. Клеточные культуры, обладающие высокой способностью к размножению *in vitro*. В диплоидных штаммах культур клеток клетки обладают в высшей степени теми же характеристиками, что и клетки ткани, из которой они получены. В перевиваемых линиях культур клеток клетки способны расти неограниченно долго и могут быть получены из здоровой ткани и опухолей. Некоторые перевиваемые линии культур клеток при некоторых условиях имеют онкогенный потенциал.

Производственная клеточная культура. Клеточная культура, предназначенная для использования в производстве; может быть получена из одного или нескольких контейнеров рабочего банка культур клеток (рабочего банка культур микроорганизмов) или может представлять собой исходную клеточную культуру.

Контрольные клетки. Некоторое количество клеток, которые при прививке вируса откладываются в качестве неинфицированной клеточной культуры.

Неинфицированные клеточные культуры содержатся при условиях, аналогичных тем, которые создаются для производства клеточных культур.

Однократный сбор. Материал, полученный в одном или нескольких случаях из одной производственной клеточной культуры, привитой одному и тому же рабочему банку культур микроорганизмов, или суспензия, полученная из рабочего банка культур микроорганизмов, инкубированная и собранная в один производственный период.

Моновалентный объединенный сбор. Объединенный материал, содержащий один штамм, тип микроорганизма или антиген и полученный из некоторого количества яиц, контейнеров с клеточными культурами и т.п., которые обрабатываются одновременно.

Конечная масса вакцины. Материал, прошедший все стадии производства, кроме конечного заполнения. Он состоит из одного или нескольких моновалентных объединенных сборов из культур одного или нескольких видов микроорганизма после очистки, растворения или добавления какого-либо активизирующего или другого вспомогательного вещества. Он обрабатывается для обеспечения его гомогенности и используется для заполнения контейнеров одной или нескольких конечных партий (серий).

Конечная партия (серия). Совокупность закрытых конечных контейнеров или других конечных единиц дозировки, которые считаются гомогенными и равнозначными в отношении риска заражения во время заполнения или приготовления конечной продукции. Единицы дозировки заполняются или готовятся другим способом из одной и той же конечной массы вакцины, при необходимости лиофильно высушиваются и запечатываются в рамках одного непрерывного рабочего процесса. Они имеют отличительный номер или код, идентифицирующий конечную партию (серию). Если конечная масса вакцины разливается и/или лиофильно высушивается в рамках нескольких рабочих процессов, это приводит к появлению связанных конечных партий (серий), которые обычно идентифицируются при помощи использования общей части в отличительном номере или коде; эти связанные конечные партии (серии) иногда называются субсериями, субпартиями или партиями заливки.

Комбинированная вакцина. Многокомпонентный препарат с рецептурой, при которой одновременно вводятся различные антигены. Различные антигенные компоненты предназначены для защиты от разных штаммов или типов одного и того же организма и/или различных организмов. Комбинированная вакцина может поставляться производителем как один жидкий или лиофильно высушенный препарат или как несколько составляющих с инструкцией по смешиванию перед применением.

5.2.2. СТАИ КУР, НЕ ИМЕЮЩИХ КОНКРЕТНЫХ ПАТОГЕНОВ И ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА ВАКЦИН И КОНТРОЛЯ ИХ КАЧЕСТВА

ВВЕДЕНИЕ

В случае, если это указано, цыплята, эмбрионы или клеточные культуры, используемые при производстве или контроле качества вакцин, получают из яиц кур, не зараженных конкретными патогенами (НЗКП). Статус НЗКП стаи кур обеспечивается по средствам описанной ниже системы. Приведенный список микроорганизмов основан на имеющихся знаниях и при необходимости будет дополняться.

ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ И ПРОЦЕДУРЫ

Под стаей понимается группа птиц, проживающая в одном и том же окружении, за которыми ухаживают лица, не имеющие контакта с зараженными

конкретными патогенами стаями. После определения границ стаи в нее не добавляют зараженных конкретными патогенами птиц.

Для НЗКП стай, создаваемых на постоянной основе, все цыплята для замены выводятся и выращиваются в курятниках с регулируемой средой. По договоренности с компетентными органами в стаю могут добавляться НЗКП эмбрионы из проверенной НЗКП стаи из другого курятника, расположенного в той же местности. Начиная с возраста 8 недель эти птицы, предназначенные на замену, считаются стаей, и за ними ведется ежемесячное наблюдение в соответствии с требованиями «Последующего тестирования». Перед откладыванием яиц все эти птицы, предназначенные на замену, проверяются в соответствии с требованиями «Исходного тестирования».

Стая содержится в таких условиях, чтобы свести к минимуму вероятность контаминации. Ее нельзя размещаться неподалеку от стай птиц, зараженных конкретными патогенами. Стая должна содержаться в изоляторе или в здании с фильтруемым воздухом с давлением выше атмосферного. Следует также принять соответствующие меры для предотвращения доступа грызунов, диких птиц, насекомых и лиц, не имеющих соответствующего разрешения.

Персонал, имеющий разрешение на вход в помещение, не должен иметь контакта с другими птицами или веществами, которые могут инфицировать стаю. Перед входом в курятник персоналу рекомендуется принимать душ и переодеваться или надевать защитную одежду.

Предметы, которые приносятся в стаю, необходимо стерилизовать. Корм должен соответствующим образом обрабатываться, чтобы избежать попадания нежелательных микроорганизмов, а вода должна быть хлорированной. Нельзя давать стае лекарств, которые могли бы помешать распознаванию болезни в стае.

Необходимо вести постоянные записи об общем здоровье стаи и расследовать любые отклонения. Факторы, за которыми следует наблюдать, включают: заболеваемость, смертность, общее физическое состояние, потребление корма, ежедневное производство яиц и качество яиц, плодовитость и выводимость. Грязные яйца должны выбрасываться; поверхность чистых яиц можно продезинфицировать, пока они теплые.

Стая должна создаваться из птиц, проверки которых показали, что они не заражены возбудителями, передающимися по вертикали. В частности, каждая курица, из которой складывается стая, постоянно проверяется на заражение вирусами лейкоза и отсутствие антител на них. Чтобы присвоить стае статус НЗКП, она содержится в условиях НЗКП в течение тестового периода продолжительностью не менее 4 месяцев. Через 6 недель и в конце тестового периода у каждой птицы в стае должны отсутствовать признаки инфицирования микроорганизмами, приведенными в разделе «Исходное тестирование».

Для каждого нового поколения в сложившейся стае все птицы в стае не позднее, чем в возрасте 20 недель, проверяются с использованием тестов, предусмотренных ниже в разделе «Исходное тестирование». После первоначального тестирования следует ежемесячно проводить тестирование представительной выборки из 5 % птиц (но не менее десяти и не более двухсот птиц) с использованием тестов, предусмотренных ниже в разделе «Последующее тестирование», причем последний тест должен проводиться через 4 недели после последнего сбора яиц.

Для всех тестов у соответствующего количества птиц в определенное время берется проба крови. Получаемые в результате пробы сыворотки крови проверяются на наличие антител на соответствующие микроорганизмы. Тесты на нейтрализацию сыворотки проводятся на совокупностях не более пяти проб. Все остальные тесты проводятся на каждой пробе сыворотки в отдельности. Во всех тестах применяются положительные и отрицательные контрольные птицы. Все используемые в тестах реагенты должны, по возможности, соответствовать международным или европейским стандартам. При проведении теста на вирус

птичьего лейкоза в дополнение к тесту на антитела, выполняемому на пробах сыворотки крови, следует брать соответствующие пробы для тестирования на этот вирус.

Кроме серологических тестов, минимум раз в неделю необходимо проводить клиническое исследование для подтверждения отсутствия заражения птиц птичьей оспой и другими инфекциями. Для каждой умершей птицы следует проводить вскрытие и, если есть необходимость подтверждения диагноза, гистопатологические исследования для выявления признаков инфекции. Каждые 4 недели необходимо проводить культуральный анализ проб экскрементов на наличие *Salmonella*; для этих тестов можно использовать совокупность до 10 проб.

Если на любой из тестов, направленных на присвоение стае статуса НЗКП, получен положительный результат, стая не может считаться НЗКП стаей. Если на любой из тестов стаи со статусом НЗКП получен положительный результат, стая теряет свой статус НЗКП. Особые условия применимы к возбудителю куриной анемии (ВКА), как описано ниже. Любые куры, эмбрионы или клеточные культуры, собранные после предыдущего отрицательного теста, непригодны для использования: любую продукцию, полученную из них, следует выбросить, и все тесты контроля качества, проведенные на них, считаются недействительными, и их необходимо провести повторно.

Для повторного получения статуса НЗКП стая должна содержаться в НЗКП условиях, должно продолжаться регулярное ежемесячное тестирование 5 % птиц, и, кроме того, каждая птица в стае ежемесячно проверяется на инфицирование тем возбудителем, на который была получена положительная реакция. Инфицированные птицы и их потомство удаляются из стаи. Статус НЗКП может быть возвращен после двух таких последовательных тестов, на которые была получена полностью отрицательная реакция.

Положительная реакция на ВКА не исключает использование материала, полученного от стаи, но живые вакцины для применения на птицах младше 7 дней жизни должны производиться только с использованием материала от стай с отрицательной реакцией на ВКА. Неактивированные вакцины для использования на птицах младше 7 дней жизни могут производиться с применением материала от стай, результаты анализа которых не показали незараженность ВКА, при условии, что имеются доказательства того, что процесс инактивации инактивирует ВКА.

Постоянные записи уровня смертности и результатов тестирования стаи необходимо хранить в течение минимум пяти лет. Данные о любых ухудшениях производства яиц и выводимости, кроме случайных ухудшений, происхождение которых было установлено как неинфекционное, и о результатах тестов, показывающих инфекцию, вызванную конкретным возбудителем, должны немедленно сообщаться лицам, использующим яйца.

ИСХОДНОЕ ТЕСТИРОВАНИЕ

В зависимости от соглашения с компетентным органом возможно использование других типов тестов, при условии, что они как минимум так же точны, как приведенные ниже тесты и имеют соответствующую специфичность.

Микроорганизм	**Тип теста**
Птичий аденовирус	Ферментный иммуносорбентный анализ
Птичий вирус энцефаломиелита	Ферментный иммуносорбентный анализ
Вирус инфекционного птичьего бронхита	Ферментный иммуносорбентный анализ

Вирус инфекционного птичьего ларинготрахеита	Нейтрализация сыворотки
Вирусы птичьего лейкоза	Ферментный иммуносорбентный анализ на вирус и нейтрализация сыворотки на антитела
Вирус птичьего нефрита	Флюоресцирующее антитело
Птичьи реовирусы	Ферментный иммуносорбентный анализ
Вирус птичьего ретикулоэндотелиоза	Флюоресцирующее антитело
Возбудитель птичьей анемии	Флюоресцирующее антитело
Гемагглютинирующий птичий аденовирус (вирус синдрома снижения яйценоскости 76 - ССЯ 76)	Подавление гемагглютинации
Вирус инфекционной бурсальной болезни	Нейтрализация сыворотки для каждого серотипа, присутствующего в стране происхождения
Вирус гриппа А	Ферментный иммуносорбентный анализ
Вирус заболевания Марека	Ферментный иммуносорбентный анализ
Вирус ньюкаслской болезни	Подавление гемагглютинации
Вирус ринотрахеита индюшек	Ферментный иммуносорбентный анализ
Mycoplasma gallisepticum	Агглютинация и, для подтверждения положительной реакции, подавление гемагглютинации
Mycoplasma synoviae	Агглютинация, для подтверждения положительной реакции, подавление гемагглютинации
Salmonella pullorum	Агглютинация

ПОСЛЕДУЮЩЕЕ ТЕСТИРОВАНИЕ

В зависимости от соглашения с компетентным органом возможно использование других типов тестов, при условии, что они как минимум так же точны, как приведенные ниже тесты и имеют соответствующую специфичность.

Микроорганизм	**Тип теста**
Птичий аденовирус	Ферментный иммуносорбентный анализ
Птичий вирус энцефаломиелита	Ферментный иммуносорбентный анализ
Вирус инфекционного птичьего бронхита	Ферментный иммуносорбентный анализ
Вирус инфекционного птичьего ларинготрахеита	Нейтрализация сыворотки
Вирусы птичьего лейкоза	Ферментный иммуносорбентный анализ на вирус и нейтрализация сыворотки на антитела
Вирус птичьего нефрита	Флюоресцирующее антитело

Микроорганизм	**Тип теста**
Птичьи реовирусы	Флюоресцирующее антитело
Вирус птичьего ретикулоэндотелиоза	Флюоресцирующее антитело
Возбудитель птичьей анемии	Флюоресцирующее антитело
Гемагглютинирующий птичий аденовирус (вирус синдрома снижения яйценоскости 76 - ССЯ 76)	Подавление гемагглютинации
Вирус инфекционной бурсальной болезни	Иммунодиффузия для каждого серотипа, присутствующего в стране происхождения
Вирус гриппа А	Ферментный иммуносорбентный анализ
Вирус заболевания Марека	Ферментный иммуносорбентный анализ
Вирус ньюкаслской болезни	Подавление гемагглютинации
Вирус ринотрахеита индюшек	Ферментный иммуносорбентный анализ
Mycoplasma gallisepticum	Агглютинация и, для подтверждения положительной реакции, подавление гемагглютинации
Mycoplasma synoviae	Агглютинация, для подтверждения положительной реакции, подавление гемагглютинации
Salmonella pullorum	Агглютинация

5.2.3. СУБСТРАТЫ КЛЕТОК ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА ВАКЦИН, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ЛЮДЬМИ

Эта общая глава касается диплоидных штаммов культур клеток и перевиваемых линий культур клеток, используемых для производства вакцин для применения людьми; конкретные вопросы, связанные с вакцинами, приготовленными при помощи технологии рекомбинантной ДНК, описываются в монографии *«Продукции технологии рекомбинантной ДНК (0784)»*.

Тестирование, которое должно проводиться на различных этапах (клеточные посевы, контрольный банк культур клеток, рабочий банк культур клеток, клетки на максимальном уровне удваивания популяции или за его пределами, используемые при производстве) приведены в Таблице 5.2.3.-1. Общие условия использования культур и методов тестирования указаны ниже. Требования к использованию для производства вакцины диплоидные линий или клеток, которые прошли несколько пересевов без образования банка культур клеток, содержатся в отдельной монографии о вакцине, о которой идет речь.

Диплоидные штаммы клеток. Диплоидная штаммы клеток обладает высокой, но ограниченной способностью размножения *in vitro*.

Перевиваемые линии клеток. Перевиваемые линии клеток обладают способностью неограниченного размножения «in vitro»; клетки зачастую имеют различия в кариотипе по сравнению с диплоидными линиями; их можно получить из здоровой ткани или опухоли.

Для вакцин, предназначенных для инъекций, производимых в перевиваемых линиях клеток, в процессе очистки обеспечивается снижение количества клеток-субстратов ДНК до уровня, равного не более 10 нг на одну человеческую дозу, кроме случаев, когда необходимо иное.

Система банк культур клеток. Производство вакцин с использованием диплоидных и перевиваемых линий клеток основано на системе банков культур клеток. Возраст клеток *in vitro* считается от контрольного банка культур клеток. Каждый рабочий банк культур клеток готовится из одного или нескольких контейнеров контрольного банка культур клеток. Использование, идентификация и управление запасами контейнеров тщательно документируются.

Среды и субстанции животного или человеческого происхождения. Состав сред, применяемых для изоляции и всей последующей культуры подробно записывается, а применяемые субстанции животного происхождения не должны иметь посторонних примесей.

При использовании человеческого альбумина необходимо обеспечить соответствие монографии *«Раствор человеческого альбумина (0255)»*.

Бычья сыворотка, применяемая при приготовлении и хранении клеточных культур, должна тестироваться и быть стерильной и не зараженной бычьими вирусами, в особенности вирусом бычьей диареи и микоплазмами.

Трипсин, используемый при приготовлении клеточных культур, должен проверяться и быть стерильным и не зараженным микоплазмами и вирусами, в особенности пестивирусами и парвовирусами

Посев клеток. Данные, необходимые для оценки пригодности посева клеток, включают информацию об источнике, истории и характеристике, где это возможно.

Источник посева клеток. Для человеческих клеточных культур записывается следующая информация о доноре: этническое и географическое происхождение, возраст, пол, общее физиологическое состояние, использованная ткань или орган, результаты каких-либо тестов на наличие патогенов.

Для животных клеточных культур записывается следующая информация об источнике клеток: вид, штамм, условия разведения, географическое происхождение, возраст, пол, общее физиологическое состояние, использованная ткань или орган, результаты каких-либо тестов на наличие патогенов.

Клетки нейронального происхождения, такие как нейробластома и линии клеток P12, которые могут репродуцироваться возбудителем губчатообразной энцефалопатии (их клетки чувствительны к прионам), не могут быть использованы для производства вакцин.

История посева клеток. Записывается следующая информация: метод, используемый для изоляции посева клеток, и любые другие процедуры, применяемые для создания контрольного банка клеток, в особенности те, которые могут подвергнуть клетки воздействию посторонних веществ.

Возможно, что полная информация об источнике происхождения культуры клеток неизвестна. Где это оправдано и разрешено, банки культур клеток с использованием таких культур, могут применяться в производстве таких вакцин.

Характеристика посева клеток. Следует изучить следующие свойства:

(1) природу клеток (например, изоферменты, серология, состав нуклеиновой кислоты);

(2) характеристики роста клеток и их морфологические свойства (световые и электронные микроскопы);

(3) для диплоидных клеток – кариотип;

(4) для диплоидных штаммов клеток – продолжительность жизни *in vitro*, выраженная в уровне удвоения популяции.

Стабильность субстрата клеток. Необходимо продемонстрировать соответствующую жизнестойкость культур клеток в предполагаемых условиях хранения. Чтобы конкретный продукт мог быть подготовлен в культурах клеток,

необходимо продемонстрировать, что последовательное производство может быть достигнуто с клетками на уровнях перехода в начале и в конце предполагаемого срока использования.

Посторонние возбудители инфекций. Культур клеток для производства вакцин не должны иметь посторонних возбудителей инфекций. Тесты на выявление посторонних веществ проводятся, как показано в Таблице 5.2.3.-1.

В зависимости от происхождения и культуральной истории культур клеток может потребоваться провести тесты на конкретные выбранные потенциальные контаминанты, в особенности те, о которых известно, что они инфицируют вид, от которого взяты клетки, в латентной форме, например, обезьяний вирус 40 у макак-резусов. Для культур клеток, произошедших от грызунов, для определения вирусов, характерных для конкретных видов, проводят тесты на выработку антител на мышах, крысах и хомяках.

Ниже описано, как культур клеток анализируются на наличие ретровирусов. Колонии клеток, в которых обнаружено присутствие ретровирусов, способных размножаться, не подходят для производства вакцин.

Опухолеродность. Культура клеток для приготовления живых вакцин не должна вызывать новообразований на любом уровне удвоения популяции, используемом для производства вакцин. Если для производства других типов вакцин используется культур клеток, вызывающая новообразования, процесс очистки должен демонстрировать, что остаточное количество клеток-субстратов ДНК снижено до 10 нг на одну человеческую дозу вакцины, кроме случаев, когда предусмотрено иное, и что количество клеткок-субстратов белка снижено до приемлемого уровня.

Культура клеток, о которой известно, что она может вызывать новообразования, не нуждается в дальнейшем тестировании. Если культур клеток имеет опухолеродный потенциал неизвестного характера, ее либо рассматривают как опухолеродную, либо проверяют на опухолеродность с использованием теста *in vitro*, описанного ниже. Если результат теста *in vitro* отрицательный или неопределенно положительный, проводится приведенный ниже тест *in vivo*. Тесты проводятся с использованием клеток на максимальном уровне удвоения популяции, который будет применяться при производстве вакцин, или за его пределами.

Культуры клеток MRC-5, WI-38 и FRhL-2 признаны неопухолеродными и не требуют дополнительного тестирования.

Хромосомная характеристика. Необходимо доказать, что диплоидный штамм клеток имеет диплоидный набор хромосом. Если удаление неповрежденных клеток во время обработки после сбора не подтвердилось, необходимо провести более детальную характеристику диплоидной колонии клеток при помощи анализа кариотипа. Необходимо исследовать пробы из четырех пересевах, равномерно распределенных по всей протяженности жизни колонии клеток. Для точного подсчета хромосом и частоты гиперплоидии, гипоплоидии, полиплоидии, повреждений и структурных аномалий следует исследовать минимум 200 клеток в метафазе.

Культуры клеток MRC-5, WI-38 и FRhL-2 признаны диплоидными и хорошо охарактеризованными; если они не модифицированы генетически, дополнительные характеристики не требуются.

Таблица 5.2.3.-1. *Тестирование колоний клеток*

Тест	Посев клеток	Контрольный банк клеток (КБК)	Рабочий банк культур клеток (РБК)	Клетки на максимальном уровне удвоения популяции, или за его

				пределами, используемые для производства
		1. ПРИРОДА И ЧИСТОТА		
Морфология	+	+	+	+
Соответствующий выбор из следующих тестов: биохимический (например, изоферменты), иммунологический (например, гистосовместимость), цитогенетические маркеры, состав нулеиновой кислоты	+	+	+	+
Кариотип (диплоидные колонии клеток)	+	+	+(1)	+(1)
Продолжительность жизни (диплоидные колонии клеток)	-	+	+	-
		2. ПОСТОРОННИЕ ВЕЩЕСТВА		
Заражение бактериями или грибами	-	+	+	-
Микоплазмы	-	+	+	-
Тесты клеточных культур	-	-	+	-
Совместная культивация	-	-	+(2)	+(2)
Тесты животных и яиц	-	-	+(2)	+(2)
Конкретные тесты на возможные загрязняющие вещества в зависимости от происхождения клеток (см. выше пункт «Посторонние возбудители инфекций»	-	-	+(2)	+(2)
Ретровирусы	-	+(3)	-	+(3)
		3. ОПУХОЛЕРОДНОСТЬ		
Опухолеродность	-	-	-	+(4)

(1) Диплоидная природа устанавливается для каждого рабочего банка культур клеток, но с использованием клеток на максимальном уровне удвоения популяции, используемом для производства, или за его пределами.

[2] Тестирование проводится для каждого рабочего банка культур клеток, но с использованием клеток на максимальном уровне удвоения популяции, используемом для производства, или за его пределами.

[3] Тестирование проводится для контрольного банка культур клеток, но с использованием клеток на максимальном уровне удвоения популяции, используемом для производства, или за его пределами.

[4] Культура клеток MRC-5, культура клеток WI-38 и культура клеток RFhL-2 признаны неопухолеродными и не требуют тестирования. Тесты не проводятся на колониях клеток, о которых известно или предполагается, что они опухолеродны.

МЕТОДЫ ТЕСТИРОВАНИЯ ДЛЯ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР

Идентификация. Для установления природы клеток примените анализ состава нуклеиновой кислоты и соответствующие из приведенных ниже тестов:

(1) биохимические характеристики (изоферментный анализ);

(2) иммунологические характеристики (антигены гистосовместимости);

(3) цитогенные маркеры.

Контаминация клеток. Анализ состава нуклеиновой кислоты, проводимый для идентификации, служит также для того, чтобы продемонстрировать отсутствие заражающих клеток.

Контаминация бактериями и грибами. Контрольный банк культур клеток и каждый рабочий банк культур клеток должны проходить тест на стерильность (*2.6.1.*), выполняемый с использованием 10 мл надосадочной жидкости из клеточных культур для каждого средства. Тест должен проводиться на 1 % контейнеров, но как минимум на 2 контейнерах.

Микоплазмы (*2.6.7.*). Контрольный банк культур клеток и каждый рабочий банк культур клеток должны проходить тест на микоплазмы культуральным методом и методом клеточной культуры-индикатора. В тесте должны участвовать один или несколько контейнеров.

Тесты на микроорганизмы-контаминанты. Клетки должны проходить тест на гемадсорбирующие вирусы и тесты клеточных культур на другие посторонние вещества, приведенные в главе *2.6.16* под заголовком «Производственная клеточная культура: контрольные клетки». Если клетки взяты от обезьян, они, кроме того, инокулируются в клеточные культуры печени кролика для выявления реакции на вирус герпеса B (cercopithecid herpesvirus 1).

Совместная культивация. Необходимо культивировать неповрежденные и поврежденные клетки отдельно с другими системами клеток, в том числе человеческих клеток и обезьяньих клеток. Следует проводить исследования для выявления возможных морфологических изменений. Тесты проводятся на жидкостях клеточных культур для обнаружения гемагглютинирующих вирусов. Клетки проходят тест, если не обнаружено доказательств наличия какого-либо постороннего вещества.

Ретровирусы. Проверка присутствия ретровирусов осуществляется с помощью использования:

(1) анализов на инфекционность;

(2) трансмиссионной электронной микроскопии;

(3) если тесты (1) и (2) дали отрицательную реакцию, проводится анализ на обратную транскриптазу (в присутствии магния и марганца) на гранулах, полученных высокоскоростным центрифугированием.

Тесты на животных. Следует ввести внутримышечно (или, для мышей, питающихся молоком матери, подкожно) в каждую из следующих групп животных 10^7 жизнеспособных клеток, разделенных поровну между животными в каждой группе:

(1) два помета детенышей мыши в возрасте менее 24 часов, общим числом не менее 10 животных;

(2) десять взрослых мышей.

Следует ввести интрацеребрально в каждую из десяти взрослых мышей 10^6 жизнеспособных клеток для обнаружения возможного присутствия вируса лимфоцитарного хориоменингита.

Наблюдение за животными осуществляется в течение минимум 4 недель. Следует также обследовать заболевших животных или животных, у которых наблюдаются аномалии, для определения причины заболевания. Клетки проходят тест, если не обнаружено доказательств наличия какого-либо постороннего вещества. Тест считается недействительным, если менее 80% животных в каждой группе остаются здоровыми и доживают до конца периода наблюдения.

Для клеток, полученных от какого-либо вида грызуна (например, клеток яичников китайского хомяка или клеток почек детеныша хомяка), проводятся тесты на антитела на возможных возбудителей вируса у исследуемого вида. Тесты проводятся на животных, которым вводятся клетки.

Тесты на яйцах. Используя посевной материал в количестве 10^6 жизнеспособных клеток на каждое яйцо, следует ввести клетки в аллантоисную полость десяти НЗКП куриных яиц с эмбрионами внутри (*5.2.2*) 9-11-дневного возраста и в желточный мешок десяти НЗКП куриных яиц с эмбрионами внутри 5-6-дневной свежести. Выдержать в течение не менее 5 дней. Протестировать аллантоисную жидкость на наличие гемагглютининов, используя эритроциты млекопитающих и птиц; проводить тест при температуре 5 ± 3 °С и 20-25 °С и прочитайте результат через 30 и 60 минут. Клетки проходят тест, если не обнаружено доказательств наличия какого-либо постороннего вещества. Тест считается недействительным, если менее 80 % эмбрионов остаются здоровыми и доживают до конца периода наблюдения.

Тесты на опухолеродность *in vitro*. Возможно использование следующих систем тестов:

(1) формирование колоний в мягком агаровом геле;

(2) получение инвазивного роста клеток после инокуляции в культуры органов;

(3) исследование трансформационной деятельности с использованием, например, системы анализа 3Т3 для активных онкогенов.

Тесты на опухолеродность *in vivo*. Тест состоит в сравнительном анализе исследуемой культуры клеток и соответствующим положительным контрольным результатом (например, онкогенных культур HeLa или Hep2).

Системы животных, показавшие себя пригодными для этого теста, включают:

(1) атимичных мышей (генотип Nu/Nu);

(2) новорожденных мышей, крыс или хомяков, подвергшихся действию антитимоцитной сыворотки или глобулина;

(3) облученных мышей с удаленной вилочковой железой, получивших костный мозг от здоровых мышей (T^-, B^+).

При выборе любой из систем животных культура клеток и базовые клетки вводятся при помощи инъекций в различные группы животных по 10 животных в каждой. В обоих случаях прививочный материал из 10^7 клеток в виде взвеси объемом 0,2 мл вводится внутримышечно или подкожно. Новорожденным животным вводится 0,1 мл антитимоцитной сыворотки или глобулина на 0, 2, 7 и 14 день после

рождения. Сильнодействующая сыворотка или глобулин подавляет иммунные механизмы растущих животных до уровня, при котором последующее введение 10^7 положительных базовых клеток регулярно вызывает опухоли и метастазы. Животных, которые сильно поражены и у которых наблюдаются признаки постоянно растущих опухолей, следует убивать, не дожидаясь конца теста, чтобы избежать ненужных страданий.

В конце периода наблюдения всех животных, включая базовые группы, убивают и исследуют на наличие макроскопических и микроскопических признаков разрастания привитых клеток в месте инъекции и в других органах (например, лимфатических узлах, легких, почках и печени).

Во всех тестовых системах животных следует наблюдать и ощупывать через регулярные промежутки времени для обнаружения уплотнений в месте инъекции. Любые сформировавшиеся уплотнения необходимо измерять в двух перпендикулярных измерениях и регулярно записывать эти измерения для того, чтобы определить, наблюдается ли прогрессивный рост уплотнений. Животных, у которых в периоде наблюдения уплотнения начинают уменьшаться, убивают до того, как уплотнения перестанут прощупываться, и подвергают гистологическому исследованию. Животные с прогрессивно растущими уплотнениями наблюдаются в течение 1-2 недель. Половина животных, у которых не наблюдается формирования уплотнений, наблюдается в течение 3 недель, а вторая половина – в течение 12 недель до того, как их убивают и подвергают гистологическому исследованию. Каждое животное подвергается вскрытию, которое включает обследование на предмет макроскопических признаков формирования опухолей в месте инъекции и в других органах, таких как лимфатические узлы, легкие, мозг, селезенка, почки и печень. Все опухолеобразные образования в месте инъекции подвергают гистологическому анализу. Кроме того, так как некоторые культуры клеток могут вызвать метастазы без признаков местного роста опухоли, необходимо провести гистологическое исследование всех обнаруживаемых местных лимфатических узлов и легких животных.

Тест считается недействительным, если менее чем у девяти из десяти животных, которым были введены положительные базовые клетки, наблюдаются прогрессивно растущие опухоли.

5.2.6. ОЦЕНКА БЕЗОПАСНОСТИ ВАКЦИН

Во время разработки вакцины на виде, для которого она предназначена, проводятся тесты, демонстрирующие риски применения вакцины. Живые вакцины готовятся только из штаммов организмов, безопасность которых подтверждена.

В тестах «доза» означает количество продукции, которое будет рекомендовано для применения, содержащее максимальный титр или эффективность, который будет характерен для производственных серий. Для живых вакцин серия или серии вакцины, приготовленная из самого мощного цикла, который будет использоваться при производстве, должна участвовать в тестировании.

Безопасность каждой составляющей комбинированных вакцин и безопасность комбинированного продукта должна быть доказана. Для инактивированных вакцин тесты на безопасность, проводимые на комбинированной вакцине, должны считаться достаточными для демонстрации безопасности отдельных компонентов.

Тесты, описанные ниже, модифицированные или дополненные тестами, приведенными в разделе «Производство» соответствующей монографии, могут выполняться в качестве части тестов, необходимых для демонстрации безопасности вакцины во время ее разработки.

А. ЛАБОРАТОРНЫЕ ТЕСТЫ

Безопасность применения одной дозы. Для каждого из рекомендуемых способов применения дайте по одной дозе восприимчивым животным каждого вида и категории, для которой будет предназначена вакцина. Среди этих животных должны находиться животные в самом раннем рекомендуемом возрасте и беременные животные, если возможно. Животные должны наблюдаться и обследоваться на наличие признаков ненормальных местных и соматических реакций. Где это уместно, исследования должны включать подробные макроскопические и микроскопические исследования места инъекции, проводимые после смерти животного; обычно такие исследования не нужны для животных, не используемых в пищу. Следует вести записи других объективных критериев, таких как ректальная температура (у млекопитающих), и измерения характеристик животного. Ректальная температура записывается минимум за день перед вакцинацией, во время вакцинации, через 4 часа после вакцинации и в последующие 4 дня. Наблюдение и обследование животных проводится до тех пор, пока можно ожидать реакции, но в некоторых случаях период наблюдения и обследования продлевается до минимум 14 дней после применения вакцины.

В качестве части этих исследований следует рассматривать обследование репродуктивной функции животного, когда имеются данные о том, что исходный материал, из которого была получена продукция, может представлять фактор риска. Где это предписывается монографией, проводится исследование репродуктивной функции самцов и беременных и небеременных самок, а также вредное воздействие на их потомство, включая тератогенное и абортивное воздействие.

Безопасность однократного применения превышенной дозы. Для каждого из рекомендуемых способов применения следует дать по одной превышенной дозе наиболее восприимчивой категории животных, для которых будет предназначена вакцина, включая животных в самом раннем возрасте и беременных животных, если возможно.обычно превышенная доза представляет собой 10 доз живой вакцины или 2 дозы инактивированного продукта. Животные должны наблюдаться и обследоваться на наличие признаков местных и соматических реакций. Следует вести записи других объективных критериев, таких как ректальная температура (у млекопитающих), и измерения характеристик животного. Наблюдение и обследование животных должно вестись в течение не менее 14 дней после приема вакцины.

Безопасность повторного применения одной дозы. Для выявления каких-либо отрицательных воздействий повторного применения одной дозы необходимо дать наиболее восприимчивой категории животных, для которых предназначена вакцина, повторную дозу, используя рекомендуемый способ применения. Животных следует наблюдать и исследовать в течение не менее 14 дней после последнего применения для выявления признаков соматических и местных реакций. Следует вести записи других объективных критериев, таких как ректальная температура (у млекопитающих), и измерения характеристик животного.

Остаточные вещества. Обычно нет необходимости в исследованиях наличия остаточных веществ. Однако если в производстве ветеринарных вакцин применяются вспомогательные лекарственные средства и/ или консерванты, следует учитывать вероятность попадания остаточных веществ в продукты питания. При необходимости следует исследовать воздействие этих остаточных веществ. Кроме того, в дополнение к исследованиям распространения микроорганизмов, описанным ниже, в случае с живыми вакцинами от установленных зоонотических заболеваний может потребоваться определение остаточных организмов вакцины в месте инъекции.

Отрицательное воздействие иммунологических функций. Если вакцина может оказать отрицательное воздействие на иммунную реакцию вакцинированного животного или его потомства, необходимо провести соответствующие тесты иммунологических функций.

Особые требования к живым вакцинам. Живые вакцины должны проходить следующие лабораторные тесты.

а) Распространение штамма вакцины. Распространение штамма вакцины от вакцинированных к невакцинированным животным, для которых предназначена вакцина, исследуется с применением рекомендуемого способа приема вакцины, который вероятнее всего может вызвать такое распространение. Кроме того, может быть необходимо изучить безопасность от распространения к виду, на который не рассчитана вакцина и который может оказаться очень восприимчив к данному штамму живой вакцины. Следует провести оценку того, сколько переходов штамма от животного к животному возможно при нормальных обстоятельствах, а также оценку вероятных последствий.

б) Распространение в вакцинированном животном. Необходимо провести тесты экскрементов, мочи, молока, яиц, секреции ротовой, носовой полости и других выделений на присутствие конкретного организма. Кроме того, могут потребоваться исследования распространения штамма вакцины в теле животного, причем особое внимание следует уделить местам, в которых склонны размножаться организмы. В случае с живыми вакцинами от установленных зоонотических заболеваний у животных, производящих продукты питания, такие исследования обязательны.

в) Реверсия вирулентности или ее увеличение. Для разведенных вакцин используйте наименее разведенный материал уровня цикла для животных, для которых они предназначены, между контрольной партии посевов и конечной продукцией. Для других живых вакцин используйте материал того цикла, который имеет вероятность наибольшей вирулентности для вида, для которого предназначена вакцина. Первоначальная вакцинация должна проводится с применением рекомендованного способа вакцинации, который имеет наибольшую вероятность вызова реверсии вирулентности. После этого нужно предпринять не менее пяти дополнительных последовательных циклов через животных, для которых предназначена вакцинация. Если это невозможно технически из-за неспособности организмов воспроизводиться на должном уровне, тест повторяется, и в виде, для которого предназначена вакцина, проводится столько циклов, сколько возможно. При необходимости можно провести размножение организма *in vitro* между двумя циклами *in vivo*. Циклы проводятся тем способом применения вакцины, который вероятнее всего приведет к реверсии вирулентности. Для каждого цикла используется не менее двух полностью восприимчивых животных. На каждом цикле демонстрируется присутствие живых вызванных вакциной организмов, в материале, использованном для цикла. Проводится сравнение с безопасностью материала от наиболее высокого удачного цикла с безопасностью материала, не участвовавшего в циклах.

Что касается конкретных вирусов, монография может требовать большее количество циклов в большем количестве животных, если имеющиеся данные указывают на то, что это необходимо. Как минимум конечный цикл проводится с использованием животных, которые наиболее подходят для оценки потенциального риска.

г) Биологические свойства штамма вакцины. Для как можно более точного определения внутренних биологических свойств штамма вакцины (например, нейротропизма) могут потребоваться другие тесты. Для векторных вакцин проводится оценка риска изменения тропизма или вирулентности штамма и, при необходимости, определенные тесты. Такие тесты систематически проводятся, если в штамм в качестве структурного протеина включается посторонний генный продукт.

д) Рекомбинация или геномная перестройка штамма. Следует учитывать вероятность рекомбинации или геномной перестройки полевых или других штаммов.

Б. ПОЛЕВЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты лабораторных исследований должны обычно дополняться подкрепляющими данными от полевых исследований.

Для животных, производящих продукты питания, исследования включают измерение ректальной температуры у достаточного количества животных до и после вакцинации; для других животных такие измерения проводятся, если лабораторные исследования указывают на вероятность наличия проблемы. Необходимо записывать размер и продолжительность любых местных реакций и количество животных, у которых возникли местные или соматические реакции. Если это уместно, проводятся измерения характеристик животных.

В. ЭКОТОКСИЧНОСТЬ

Необходимо проводить оценку возможного вредного воздействия вакцины на окружающую среду и выявлять необходимость каких-либо предупредительных мер для уменьшения такого риска. Следует провести оценку вероятной степени воздействия вакцины на окружающую среду с учетом: вида, для которого предназначена вакцина, и способа ее применения; выведения продукции; утилизации неиспользованной вакцины. Если эти факторы указывают на то, что на окружающую среду будет оказано значительное воздействие со стороны продукции, проводится оценка потенциальной экотоксичности с учетом свойств вакцины, выявленных, например, в ходе тестов, описанных в данном разделе.

5.2.7. ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ВАКЦИН

Во время разработки вакцины проводятся тесты, направленные на подтверждение того, что вакцина является эффективной при применении каждым из рекомендованных способов и методов вакцинации с использованием рекомендованного графика для каждого вида и категории животных, для которых предназначена данная вакцина. Тип тестов на эффективность, которые будут проводиться, будет значительно варьироваться в зависимости от конкретного типа вакцины.

В качестве части тестов, выполняемых во время разработки вакцины для определения эффективности, или в дополнение к ним возможно проведение тестов, приведенных в разделе «Производство» соответствующей монографии; необходимо учитывать следующее.

Доза, которая будет использоваться, представляет собой количество продукта, рекомендуемое к применению и содержащее минимальный титр или мощность, ожидаемый в конце срока годности.

Для производства живых вакцин используется вакцина, приготовленная из наиболее ослабленного цикла, который будет участвовать в производстве.

Все заявления об эффективности должны подтверждаться доказательствами. Например, утверждение о том, что вакцина защищает от респираторных заболеваний, должно подкрепляться как минимум доказательством защиты от клинических проявлений респираторных заболеваний. Если о вакцине заявляется, что она защищает от инфекций, это должно быть доказано с использованием методов реизоляции. Если таких утверждений несколько, для каждого из них требуется подкрепляющее доказательство.

Необходимо провести адекватную оценку влияния пассивно приобретенных антител или антител материнского происхождения на эффективность вакцины. Все утверждения, выраженные или подразумеваемые, касающиеся начала и продолжительности защиты, должны подкрепляться данными испытаний.

Эффективность каждой из составляющих многовалентных и комбинированных продуктов должна демонстрироваться с использованием комбинированной вакцины.

Если рекомендуется одновременное применение вакцин или оно входит в обычный график вакцинации, необходимо провести исследования иммунологической совместимости. Если продукт рекомендуют применять в качестве составляющей

плана по вакцинации, необходимо продемонстрировать возбуждающий или усиливающий эффект или вклад продукта в план вакцинации в целом.

ЛАБОРАТОРНЫЕ ТЕСТЫ

В принципе, демонстрация эффективности должна проводиться в хорошо контролируемых лабораторных условиях при помощи введения в организм животного, для которого предназначена вакцина, вещества, провоцирующего выделение антител, после введения вакцины, с соблюдением всех рекомендуемых условий применения. В качестве вещества, провоцирующего выработку антител, применяют штамм, отличный от использованного в производстве вакцины. Насколько это возможно, условия введения этого штамма должны быть приближены к естественным условиям заражения, например, что касается количества организмов, провоцирующих выработку антител, или метода их введения.

Если возможно, необходимо определить механизм иммунитета (клеточный/ гуморальный, местный/ общий, классы иммуноглобулина), вызываемый после введения вакцины животным, для которых она предназначена.

ПОЛЕВЫЕ ИСПЫТАНИЯ

В общем, результаты лабораторных тестов должны дополняться данными от полевых испытаний, проводимых с контрольными животными, которым не вводилась вакцина. Если лабораторные испытания не могут подтвердить эффективность, приемлемым может быть только результат полевых испытаний.

5.2.8. СНИЖЕНИЕ РИСКА ПЕРЕДАЧИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ГУБЧАТОЙ ЭНЦЕФАЛОПАТИИ ЧЕРЕЗ ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА

1. ОБЩИЕ ЗАМЕЧАНИЯ

2. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ОБЩЕЙ ГЛАВЫ

3. ПРОИЗВОДСТВО (ВКЛЮЧАЯ СБОР МАТЕРИАЛОВ-ИСТОЧНИКОВ)

3.1. Животные как источник материала

3.2. Части тела животных, жидкости и выделения как исходные материалы

3.3. Проверка процесса

3.4. Возраст животных

3.5. Конкретная продукция

4. ЗАКЛЮЧИТЕЛЬНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ

1. ОБЩИЕ ЗАМЕЧАНИЯ

Инфекционные губчатые энцефалопатии (ИГЭ) включают почесуху овец и коз, хроническую карликовую болезнь мулов, оленей и лосей, бычью губчатую энцефалопатию (БГЭ) скота, а также куру и болезнь Крейтцфельдта-Якоба (БКЯ) у людей. Возбудители этих болезней размножаются в инфицированных особях, обычно без признаков инфекции, которые можно обнаружить при помощи имеющихся диагностических тестов, проводимых *in vivo*. После инкубационного периода продолжительностью до нескольких лет возбудители вызывают болезнь и в конце концов ведут к смерти. Методов лечения неизвестно.

Диагноз основан на клинических признаках, подтверждающихся во время вскрытия, характерных гистопатологических поражений мозга или при помощи

обнаружения фибриллярные белков, характерных для губчатых энцефалопатий. Для подтверждения диагноза может также применяться демонстрация инфективности при помощи инокуляции предполагаемо пораженных тканей в лабораторных животных, но инкубационный период при этом длится месяцы или годы. Имеются сведения о ятрогенной передаче губчатых энцефалопатий. Что касается овец, почесуха была случайно передана им во время применения вакцины «Louping Ill», приготовленной из объединенных овечьих мозга и селезенки, обработанных формальдегидом, в которую ненамеренно был включен материал от зараженных почесухой овец. В случае с человеком, имеются случаи передачи БКЯ, приписываемые неоднократному парентеральному приему гормона роста и гонадотропина, полученных из гипофиза умерших людей. Кроме того, случаи БКЯ приписываются использованию зараженных инструментов при операциях на головном мозге и трансплантациях оболочек головного мозга и роговицы у людей.

Информация о характеристиках этих возбудителей ограничена. Они чрезвычайно устойчивы к большинству химических и физических процедур, инактивирующих обычные вирусы. Они не вызывают обнаруживаемой иммунной реакции. Существуют естественные барьеры, ограничивающие межвидовое распространение инфекции, но при соответствующих обстоятельствах их можно преодолеть. Обычно это зависит от штамма, дозы, метода воздействия и размера барьера между видами. Исследования лабораторных животных показали, что наиболее эффективным методом является внутримозговая инокуляция.

В естественных условиях человек подвергался воздействию возбудителя овечьей почесухи в течение как минимум 200 лет, но несмотря на проведенные обширные эпидемиологические исследования, не было обнаружено признаков передачи почесухи людям. БГЭ впервые был распознан в Великобритании в 1986 г. Им было поражено большое количество скота и отдельных стад. Очевидно, что БГЭ является заболеванием, передающимся через пищу. В других странах наблюдались случаи БГЭ, либо после вывоза животных из Великобритании, либо у местных животных. Хотя биологические свойства возбудителя БГЭ отличаются от свойств возбудителя почесухи, вероятно, что межвидовые барьеры могут быть разными. Имеются убедительные доказательства, показывающие, что новая разновидность БКЯ вызывается возбудителем, вызывающим БГЭ у скота.

Появление новой разновидности БКЯ у людей вызвало озабоченность, что и возбудитель БГЭ может передаваться человеку. Таким образом, необходимо с осторожностью использовать для производства лекарственных средств биологические материалы от видов, поражаемых этими болезнями, за пределами экспериментов.

Таким образом, для снижения риска заражения необходимо выполнять приведенные ниже рекомендации. Несмотря на эту общую главу, следует подчеркнуть, что потенциальный риск, связанный с конкретным лекарственным средством, должен рассматриваться в каждом случае отдельно в свете конкретных обстоятельств и имеющихся знаний.

2. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ОБЩЕЙ ГЛАВЫ

Данная общая глава рассматривает значение ИГЭ для лекарственных средств для человека и животных и меры по снижению риска передачи болезни через них. Таким образом, она касается материалов животного происхождения, в особенности от жвачных животных, которые применяются для приготовления:

- активных веществ;
- наполнителей;
- сырья или исходного материала и реагентов, используемых в производстве (например, бычий сывороточный альбумин, ферменты, культуральные среды, в том числе для приготовления рабочих банков клеток или новых контрольных банков клеток).

Данная общая глава также касается материалов, имеющих непосредственных контакт с оборудованием, участвующим в производстве (а значит, имеющих потенциал заражения), например, в контрольной среде, применяющейся для проверки завода и оборудования.

Данная общая глава касается материала от жвачных животных. Предлагаемые меры особенно актуальны для бычьего материала и могут потребовать модификации для мер, касающихся материала от овец, коз и других видов, подверженных ИГЭ за рамками экспериментов.

В свете имеющихся научных знаний, несмотря на географическое происхождение, вероятность того, что молоко представляет риск заражения ИГЭ, очень мала. Следовательно, молоко и материалы, полученные из него, исключаются из области применения общей главы, при условии, что молоко получено от здоровых животных в тех же условиях, в которых получают молоко для потребления человеком[19]. Продукты из молока от жвачных животных, приготовленные с использованием других материалов от жвачных животных (таких как казеин, переработанный ферментами поджелудочной железы), не исключаются из области применения данной общей главы благодаря использованию таких других материалов от жвачных животных.

Продукты из шерсти или волос жвачных животных, такие как ланолин, спирт шерстяного жира и аминокислоты также исключаются из области применения данной общей главы, при условии, что шерсть и волосы получены от живых животных. Продукты из шерсти и волос жвачных животных, приготовленные с использованием других материалов от жвачных животных (таких как ферменты поджелудочной железы), не исключаются из области применения данной общей главы благодаря использованию таких других материалов от жвачных животных.

Данную общую главу следует читать в комплексе с различными Решениями Комиссии Европейского Сообщества, которые приводятся в исполнение с 1991 г.

3. ПРОИЗВОДСТВО (ВКЛЮЧАЯ СБОР ИСХОДНЫХ МАТЕРИАЛОВ)

Если у производителей лекарственных средств есть выбор между использованием материала от жвачных животных и материала от нежвачных животных, использование материала от нежвачных животных предпочтительнее. Замена материалов, полученных от жвачных животных, на материалы от вида, страдающего ИГЭ, или вида, который может быть ими заражен в ходе экспериментов оральным путем, обычно считается неприемлемым.

Необходимо иметь данные об источнике материалов (в том числе географическое происхождение животного) и других мерах, прдпринятых для уменьшения риска передачи возбудителей ИГЭ. Производитель лекарственного средства должен провести проверку поставщика таких материалов для того, чтобы удостовериться, что они получены и обрабатываются в соответствии с этой общей главой и соответствующими системами контроля качества.

Риск передачи возбудителей инфекции можно намного уменьшить при помощи контроля некоторых параметров. Эти параметры включают:

- источник животных;

- природа животных тканей, применяемых в производстве;

- производственный процесс (-ы).

Один из подходов не обеспечит безопасность продукции и, таким образом, все три подхода, приведенные выше, должны дополнять друг друга для снижения риска контаминации.

---

[19] Для оценки риска, связанного с ветеринарными лекарственными средствами, предназначенными для жвачных животных, и его снижения следует учитывать дополнительные факторы, касающиеся только этого вида.

3.1. ЖИВОТНЫЕ КАК ИСТОЧНИК МАТЕРИАЛА

Самым важным критерием для безопасности лекарственных средств является тщательный отбор источников материала.

3.1.1. Самым лучшим источником материала являются страны, в которых не зарегистрировано случаев БГЭ, в которых есть:

- обязательное уведомление;

- обязательная клиническая и лабораторная проверка подозрительных случаев.

Должна иметься официальная сертификация происхождения. Кроме того, необходимо обеспечить введение риска инфекции БГЭ при помощи следующих факторов:

- ввоз скота из стран с высоким уровнем заболеваемости БГЭ;

- ввоз потомства пораженных животных;

- использование в корме жвачных животных мяса и костной муки, содержащей какой-либо белок жвачных животных, полученный из стран с высоким или низким уровнем заболеваемости БГЭ или стран с неопределенным статусом.

3.1.2. Материал может также быть получен из стран с небольшим количеством случаев заболевания местных животных, если в дополнение к факторам из пункта 3.1.1:

- туши зараженных животных уничтожаются;

- потомство зараженных самок не используется;

- существует запрет на кормление жвачных животных белком млекопитающих.

Животные-источники должны быть рождены после ввода запрета на корм. Если дата рождения животного неизвестна, в целях безопасности источника следует учесть как дату ввода запрета, так и инкубационный период ИГЭ.

Стада, в которых имелись случаи заболевания БГЭ, не используются в качестве источников.

3.1.3. Нельзя использовать исходные материалы из стран с высоким уровнем заболеваемости БГЭ.

В дополнение к этим мерам производители лекарственных средств должны обосновать свою стратегию выбора источников по отношению к категории материалов, количеству исходного материала и предполагаемому использованию конечного лекарственного средства. В странах-поставщиках исходные материалы из надежно наблюдаемых стад могут иметь дополнительный запас надежности.

3.2. ЧАСТИ ТЕЛ ЖИВОТНЫХ, ЖИДКОСТИ И ВЫДЕЛЕНИЯ В КАЧЕСТВЕ ИСХОДНЫХ МАТЕРИАЛОВ

Различные органы и выделения пораженного ИГЭ животного имеют различный уровень инфекционности. На основании данных о натуральной почесухе была произведена классификация органов, тканей и жидкостей по четырем основным группам с различным потенциалом риска, как показано в Таблице 5.2.8.-1. Хотя сейчас известно, что распространение инфекционности пораженного БГЭ скота более ограничено, при выборе исходных материалов следует продолжать учитывать классификацию тканей и жидкостей животных, приведенную в таблице. Категории в таблице являются только показательными, и важно учитывать следующие моменты:

- классификация тканей в Таблице 5.2.8.-1 основана на титрации инфекционности у мышей внутримозговым способом. В экспериментальных моделях с использованием штаммов, адаптированных к лабораторным животным, могут наблюдаться более высокие титры и немного другая классификация тканей;

- в определенных ситуациях возможна перекрестная контаминация тканей различных категорий инфекционности. На возможный риск оказывают воздействие обстоятельства, при которых происходит удаление тканей, особенно при контакте материала низкой группы риска с материалом высокой группы риска. Таким образом, перекрестная контаминация некоторых тканей может увеличиваться, если зараженные животные убиваются проникающим оглушением мозга или если мозг и/ или спинной мозг разрезаются. Риск перекрестной контаминации снижается, если жидкости собирают с минимальными повреждениями тканей, а клеточные компоненты удаляются, и если кровь плода собирают без заражения другими тканями матери или плода, в том числе плацентой, амниотическими и аллантоисными жидкостями.

- риск, представляемый перекрестным заражением, зависит от некоторых дополнительных факторов, включая:

  - предосторожности, принимаемые для предотвращения контаминации во время сбора тканей (см. выше);

  - уровень контаминации (количество контаминирующей ткани);

  - количество материала, которое нужно использовать;

  - процесс, которому будет подвергнут материал во время производственного процесса.

Производители лекарственных средств должны предоставлять оценку риска.

Таблица 5.2.8.-1. *Относительные титры инфекционности почесухи в тканях и жидкостях тела от зараженных естественным путем овец и коз с клинической почесухой*[20]

Категория I	**Высокая инфекционность** Головной мозг, спинной мозг, (глаз)
Категория II	**Средняя инфекционность** Подвздошная кишка, лимфатические узлы, проксимальная толстая кишка, селезенка, миндалевидная железа, (твердая мозговая оболочка, пинеальная железа, плацента), спинномозговая жидкость, гипофиз, надпочечная железа
Категория III	**Низкая инфекционность** Дистальная толстая кишка, слизистая оболочка носа, периферические нервы, костный мозг, легкое, печень, поджелудочная железа, вилочковая железа
Категория IV	**Нет обнаруживаемой инфекционность** [21] Кровяной сгусток, экскременты, сердце, почка, грудная железа, молоко, яичник, слюна, слюнная железа, семенной пузырек, сыворотка, скелетная мышца, яичко, щитовидная железа, матка, ткани плода, (желчь, кости)[22], хрящевая ткань, соединительная ткань, волосы, кожа, моча

[20] Ткани, взятые в скобки, не титровались в исходных исследованиях, но их относительная инфекционность устанавливается другими данными о губчатых энцефалопатиях. Не вошедшие в список материалы могут классифицироваться по аналогии с указанными на основе их состава.

[21] Во время биологических проб, включающих прививку до 5 мг ткани в головной мозг грызунов, не наблюдалось передачи инфекционности.

[22] Череп и позвонки см. также пункт 3.2 о перекрестной контаминации.

3.3. ПРОВЕРКА ПРОЦЕССА

В достижении приемлемого уровня безопасности продукции самым важным критерием является контролирование источников, так как существуют документальные подтверждения того, что возбудители ИГЭ устойчивы к большинству процедур по инактивации.

Анализ беспристрастности процедур удаления/ инактивации сложно интерпретировать, так как необходимо учитывать природу введенного материала и его значимость для естественной ситуации, план исследования (в том числе пропорциональное уменьшение масштаба процессов) и метод обнаружения возбудителя (тест *in vitro* или *in vivo*) после введения и после лечения. Для понимания наиболее подходящей методологии анализа беспристрастности необходимы дальнейшие исследования. Таким образом, исследования для анализа беспристрастности в настоящее время обычно не требуются. Однако если выдвигаются заявления о способности производственных процессов удалить или инактивировать возбудителей ИГЭ, их необходимо доказать при помощи соответствующих исследований для анализа беспристрастности, которые будут зависеть от процесса.

Кроме особых ограничений, касающихся исследований анализа беспристрастности по возбудителям ИГЭ и их интерпретации, основной преградой является определение шагов по эффективному удалению или инактивации возбудителей ИГЭ в процессе производства биологических лекарственных средств. Поощряется продолжение производителем исследований методов удаления и инактивации для определения шагов/ процессов, которые принесут пользу в обеспечении удаления или инактивации возбудителей ИГЭ.

В любом случае производственный процесс, где это возможно, должен проходить с учетом имеющейся информации о предполагаемых методах удаления или инактивации возбудителей ИГЭ.

Некоторые производственные процедуры могут в значительной мере способствовать снижению риска заражения ИГЭ, например, процедуры, используемые в производстве жира и его производных (см. ниже).

3.4. ВОЗРАСТ ЖИВОТНЫХ

Так как накопление инфекционности ИГЭ происходит в течение инкубационного периода продолжительностью в несколько лет, разумным может оказаться использование в качестве источника молодых животных.

3.5. КОНКРЕТНАЯ ПРОДУКЦИЯ

- Жир, применяющийся в качестве исходного материала для выпуска производных жира, должен изготовляться по крайней мере таким же безопасным и точным методом, как методы, предусмотренные международными предписаниями. Производные жира, такие как глицерин и жирные кислоты, производимые из жира при помощи точных процессов, изучались в течение некоторого времени, и считаются неинфекционными. Примерами точных процессов являются:
  - трансстерификация или гидролиз при не температуре не ниже 200ºС в течение не менее 20 минут под давлением (производство глицерина, жирных кислот и сложных эфиров жирных кислот;
  - омыление NaOH 12 M (производство глицерина и мыла):

    - серийный процесс: при температуре не ниже 140 ºС в течение не менее 3 часов;

    - непрерывный процесс: при температуре не ниже 140 ºС, давлении 2 бара (2000 гПа) в течение не менее 8 минут, или эквивалентная обработка.

- Желатин:

- Для желатина, производимого из костей коров[23], безопасность продукта будет обеспечена соблюдением всех следующих параметров:

  - географическое происхождение животного-источника;

  - черепа и костный мозг должен удаляться из исходного материала[24];

  - рекомендуется также исключение позвонков, особенно с учетом географического происхождения;

  - предпочитаемым в настоящее время методом производства является натронная варка;

  - при наблюдении за производственным процессом и для разграничения партий (например, определения партии, разделения партий, уборка между партиями и т.д.) необходимо следовать таким системам, как сертификация ISO 9000 и АОККТ (Анализ опасностей и критическая контрольная точка);

  - должны существовать процедуры для обеспечения отслеживания и проверки поставщиков исходного материала.

- Для желатина из шкур коров:

  - следует предотвращать перекрестную контаминацию потенциально инфекционными материалами.

  Производители лекарственных средств должны предоставлять оценку риска.

4. ЗАКЛЮЧИТЕЛЬНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ

Оценка риска, связанного с ИГЭ требует тщательного учета всех перечисленных параметров, и предпочтительнее всего будет в производстве продукции фармацевтической промышленности отказаться от использования материалов, полученных от животных, подверженных ИГЭ (вне рамок экспериментов). Приемлемость конкретного лекарственного средства, содержащего такие материалы, или получающего эти материалы в результате производственного процесса, зависит от некоторого количества факторов, среди которых:

- документирование и запись источников животных;

- природа тканей животных, применяемых в производстве;

- производственный процесс (-ы);

- способ применения препарата;

- количество ткани, используемое в лекарственных средствах;

- максимальная терапевтическая дозировка (суточная доза и продолжительность лечения);

- предназначение продукции.

Производители лекарственных средств животного происхождения несут ответственность за выбор и обоснование адекватных мер. Следует учитывать уровень науки и технологии.

---

[23] Исходным материалом считаются кости до обезжиривания.

[24] Невозможно предсказать, в какие географические регионы распространяться в будущем БГЭ/ ИГЭ. Любое изменение в географическом распространении БГЭ/ ИГЭ может привести, в самом худшем случае развития ситуации, к отзыву фармацевтических средств, содержащих желатин. Так как желатин содержится в большом количестве лекарственных средств в качестве наполнителя и имеет большой срок хранения начиная от производства до окончания срока годности фармацевтических средств, любой отзыв может иметь серьезные последствия по отношению к поставкам важнейших лекарственных средств. Таким образом, необходимо удалять череп и спинной мозг из исходного материала для желатина, получаемого из коровьих костей, независимо от географического происхождения животных-источников.

Несмотря на данную общую главу, следует отметить, что потенциальные риски, связанные с конкретным лекарственным средством, должны учитываться индивидуально в свете конкретных обстоятельств и имеющихся знаний.

Настоящее руководство должно использоваться и при оценке отдельных продуктов на основании суждения «Риск/Преимущество».

5.3. СТАТИСТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ОБРАБОТКИ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА

5.3.1. СТАТИСТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ БИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ И КОЛИЧЕСТВЕННЫХ ОПРЕДЕЛЕНИЙ

ВВЕДЕНИЕ

Данная глава является руководством для планирования тестов биологической активности, описанных в Фармакопее и для анализа их результатов. Она предназначена для специалистов, у которых статистика не является основной специальностью и сферой деятельности, в том случае, если они несут ответственность за проведение количественного анализа или интерпретацию результатов этих анализов, и не могут прибегнуть к помощи и советам специалистов в области статистики. Приведенные в данной главе методы расчета не являются обязательными при выполнении количественных определений биологической активности, предусмотренных Фармакопеей. Допускается использование альтернативных методов при условии, что они не уступают по надежности методам, описанным в данной главе. Существует широкий спектр программного обеспечения, которое может быть полезно в зависимости от средств, доступных аналитику, и от его знаний и опыта.

Следует обращаться за помощью к профессионалам в ситуациях, когда:

- требуется детальная проработка плана и методов анализа, подходящих для научного исследования или разработки нового лекарственного средства;
- анализ требуется для расширенных нелинейных графиков зависимости доза-эффект, например с такой ситуацией можно столкнуться при проведении количественных иммунологических определений;
- нельзя придерживаться ограничений, накладываемых данной главой на план количественного определения, например, необходимость корректировки планов количественного определения может быть вызвана специфическими лабораторными условиями, или невозможностью применения равных количеств одинаково раздельных доз.

1.1. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ И ТОЧНОСТЬ

Биологические методы анализа применяют для количественного определения таких субстанций и препаратов, активность которых не может быть корректно оценена при помощи химических или физических методов анализа. Везде, где возможно, в основу количественных определений положен принцип сравнения со стандартным препаратом, с тем, чтобы определить какое количество анализируемой субстанции даст такой же биологический эффект как определенное количество (*Единица)* стандартного препарата. Существенным условием проведения таких биологических количественных определений является то, что анализ стандартного препарата и исследуемой субстанции должен быть выполнен в одно и тоже время и при идентичных условиях.

Для некоторых количественных определений (например, определения титра вируса) активность испытуемого образца не выражается относительно стандарта. Такой тип количественного определения рассмотрен в Разделе 4.5.

Любая оценка активности, полученная в ходе биологического количественного определения включает случайную ошибку, обусловленную свойственной биологическим реакциям изменчивостью и, если это возможно, следует провести вычисление ошибки, результатов каждого количественного определения, даже в случае использования официального метода определения. В этой связи ниже приведены методы планирова-

ния количественных определений и вычисления их ошибок. Каждый раз, перед тем как остановиться на том или ином статистическом методе, следует провести предварительное исследование с определенным числом повторений, чтобы убедиться в применимости этого метода.

Доверительный интервал активности характеризует точность, с которой была оценена активность при количественном определении. Он рассчитывается исходя из плана эксперимента и объема выборки. При биологических количественных определениях обычно выбирается 95% доверительный интервал. Для расчета границ этого интервала применяются методы математической статистики, с тем, чтобы гарантировать утверждение, что существует 95% вероятность того, что действительное значение активности находится в данном интервале. Является ли эта точность приемлемой для Фармакопеи, зависит от требований, установленных в частной статье на конкретный препарат.

Термины «среднее» и «стандартное отклонение» используются в данном разделе в соответствии с их определением в большинстве руководств по биометрии.

Термины «заявленная активность» или «активность, указанная в маркировке», «установленная активность», «предполагаемая активность», «отношение активностей» и «рассчитанная активность» используются в данном разделе для обозначения следующих понятий:

- «заявленная активность» или «активность, указанная в маркировке»: для готового препарата – номинальное значение, установленное на основании известной активности исходного материала; для исходного материала – активность, установленная производителем;
- «установленная активность» – активность стандартного препарата;
- «предполагаемая активность»: временно установленная активность испытуемого препарата, на основании которой рассчитываются дозы, которые были бы эквивалентны дозам используемого стандартного препарата;
- «отношение активностей» испытуемого препарата; отношение равноактивных доз стандартного препарата и испытуемого препарата в условиях количественного определения;
- «рассчитанная активность» - активность, рассчитанная на основании данных количественного определения.

В разделе 9 (глоссарий символов) приведены наиболее важные, используемые в данной главе символы. Если в тексте используется символ, не приведенный в этом разделе, или символ используется в другом значении, то его определение дается в той части текста.

2. РАНДОМИЗАЦИЯ И НЕЗАВИСИМОСТЬ КОНКРЕТНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Применение различных методов воздействий к различным экспериментальным объектам (животные, пробирки и т.д.) должно быть осуществлено определенным строго случайным образом. Любой другой выбор экспериментальных условий, который преднамеренно не учитывается в плане эксперимента, также должен быть выполнен случайным образом. Например, выбор размещения боксов в лаборатории и порядок проведения исследований. В частности, группа животных, получающих одинаковую дозу какого-нибудь препарата, не должна одновременно подвергаться исследованию (в то же самое время или в том же самом месте), до тех пор, пока не будет весомых доказательств того, что источник вариации (например, между временем или между положениями) является незначительным. Рандомизация может быть осуществлена с использованием компьютера при помощи встроенной функции случайных чисел. Каждый раз,

после запуска программы аналитик должен убедиться, что генерируется новая последовательность случайных чисел.

Препараты, назначаемые каждому экспериментальному объекту, должны быть настолько независимы, насколько это возможно. В пределах каждой экспериментальной группы, разведения, назначенные каждой группе, должны быть не просто разведениями одной и той же дозы, но и должны быть приготовлены индивидуально. Без выполнения данного условия, вариабельность, свойственная препарату, не будет полностью представлена в дисперсии ошибки эксперимента. В результате будет недооценена неисключенная погрешность, что может привести к:

1) необоснованному ужесточению исследования при дисперсионном анализе (см. Разделы 3.2.3 и 3.2.4);
2) недооценке действительных доверительных интервалов при испытании, которые, как показано в Разделе 3.2.5, рассчитаны исходя из оценки s^2 (средний квадрат неисключенной ошибки).

3. КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ, ОСНОВАННЫЕ НА КОЛИЧЕСТВЕННЫХ ЭФФЕКТАХ

3.1. СТАТИСТИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ

3.1.1 ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ

Количественные определения биологической активности, включенные в Фармакопею, основаны на «принципе разведения». Это означает, что анализируемый испытуемый препарат предположительно содержит то же самое активное вещество, что и стандартный препарат, но отличается от последнего соотношением активного и неактивного компонентов. В этом случае испытуемый препарат можно теоретически получить из стандартного путем его разведения неактивными компонентами. Для того, чтобы проверить, подчиняется ли какой-либо конкретный тест количественного определения «принципу разведения», необходимо сравнить зависимость доза-эффект стандартного и испытуемого препаратов. Если эти зависимости различаются статистически значимо, то теоретическая модель «принципа разведения» не является достоверной. Статистически значимые различия в зависимостях доза-эффект для стандартного и испытуемого препаратов позволяют предположить, что один из препаратов, кроме активного компонента, содержит другие компоненты, которые обладают активностью или влияют на измеряемые результаты.

Для того, чтобы в теоретической модели достигнуть более выраженного эффекта разведения, следует преобразовать зависимость доза-эффект в линейную функцию в наибольшем возможном интервале доз. В качестве модели для рассматриваемых количественных определений биологической активности интерес представляют две модели: модель параллельных линий и модель угловых коэффициентов.

Применение той или иной модели зависит от выполнения следующих условий:

1) различные воздействия у экспериментальных объектов были выполнены случайным образом;
2) результаты каждого исследования подчиняются закону нормального распределения;
3) стандартные отклонения эффектов в каждой исследуемой группе, как для стандартного, так и для испытуемого препаратов, статистически не отличаются друг от друга.

При разработке методики количественного определения, аналитик должен убедиться, что полученные данные от различных количественных определений удовлетворяют этим теоретическим условиям.

- Условие 1 может быть выполнено при помощи использования Раздела 2.
- Условие 2 является предположением, которое на практике почти всегда выполняется. Незначительные отклонения от этого предположения, в основном, не вносят серьезных ошибок в анализ, поскольку исследование включает несколько повторений. В случае сомнения, может быть выполнена проверка на нормальность (например, при помощи критерия Шапиро-Уилка (Shapiro-Wilk)[1]).
- Для проверки выполнения Условия 3 могут быть использованы тесты проверки однородности дисперсий (например, критерий Бартлетта (Bartlett)[2], критерий Кокрена (Cochrane)[3]). Для этих целей также может быть использовано графическое представление результатов анализа (см. примеры в Разделе 5).

Если условия 2 и/или 3 не выполняются, то преобразование результатов может привести к улучшению выполнения этих условий. Примерами таких преобразований являются логарифмическое (*ln y)*, квадратичное ($\sqrt{y}$, y^2).

- Логарифмическое преобразование значений *y* в *ln y*, может быть полезно если однородность дисперсий неудовлетворительна. Оно также может улучшить нормальность распределения, если оно смещено вправо.
- Преобразование *y* в $\sqrt{y}$ можно использовать в случае, если результаты подчиняются распределению Пуассона, то есть, если они получены путем вычислений.
- Преобразование *y* в y^2 может быть использовано, если, например, доза в большей мере пропорциональна площади ингибирования зоны роста микроорганизмов, чем измеренному диаметру этой зоны роста.

Существует другая категория тестов, когда при анализе результат не может быть количественно измерен для каждого экспериментального объекта, а определяется как часть выборки у которой получен ответ на воздействие. Эта категория рассмотрена в Разделе 4.

3.1.2 ПОСТОЯННЫЕ РУТИННЫЕ КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ

При постоянном проведении количественного определения, практически отсутствует возможность систематически контролировать выполнение условий 1-3, так как ограниченное число измерений в каждом анализе может влиять на чувствительность статистических тестов. Однако специалисты по статистическому анализупоказали, что при симметричных сбалансированных анализах, небольшие отклонения от однородности дисперсий и нормальности распределения не оказывают существенного влияния на результаты количественного определения. Вопрос о применимости статистической модели следует ставить под сомнение только в том случае, если ряд полученных результатов имеет сомнительную достоверность. При этом может возникнуть необходимость выполнить новую серию предварительных исследований, как описано в Разделе 3.1.1.

---

[1] Wilk, M.B. and Shapiro, S.S. (1968). The joint assesment of normality of several independent samples, *Technometrics* 10, 825-839.
[2] Bartlett, M.S. (1937). Properties of sufficiency and statistical tests, *Proc. Roy. Soc.* London, Series A 160, 280-282.
[3] Cochran, W.G. (1951). Testing a linear relation among variances, *Biometrics* 7, 17-32.

В зависимости от применяемой статистической модели следует контролировать выполнение двух дополнительных условий:

Для модели параллельных линий:

4А) Взаимосвязь между логарифмом дозы и результатом может быть представлено в виде прямой линии во всем диапазоне исследованных доз.

5А) При анализе прямая линия для любого испытуемого препарата параллельна соответствующей прямой линии для стандартного препарата.

Для модели угловых коэффициентов:

4В) Во всем диапазоне исследованных доз отношение между дозой и полученным эффектом для каждого препарата может быть представлено в виде прямой линии.

5В) При анализе для любого испытуемого препарата прямая линия пересекает ось *y* (при дозе, равной нулю) в той же точке, что и прямая линия для стандартного препарата (другими словами, при анализе графики результирующей функции эффектов всех испытуемых препаратов должны пересекаться с графиками результирующей функции эффектов стандартного препарата в одной и той же точке).

Условия 4А и 4В могут быть проверены при количественных определениях в которых использовано как минимум по три разведения для каждого протестированного препарата. Использование результатов количественного определения, полученных при одном или двух разведениях, может быть обосновано лишь в том случае, если накопленный опыт свидетельствует, что условия линейности, параллельности или совпадение точек пересечения всегда выполняются.

После получения результатов количественного определения и перед вычислением относительной активности каждого препарата, выполняется дисперсионный анализ с целью проверки выполнения условий 4А и 5А (или 4В и 5В). Для этого общую сумму квадратов делят на определенное число сумм квадратов, соответствующих каждому выполняемому условию. Оставшиеся суммы квадратов представляют собой неисключенную (остаточную) погрешность определения. При помощи ряда F-отношений можно оценить отсутствие или наличие значимых источников вариации, для этой неисключенной (остаточной) погрешности определения.

Когда методика анализа провалидирована, активность каждого испытуемого препарата по отношению к стандартному может быть рассчитана и выражена как отношение активностей или преобразована в определенные единицы активности, например, в международные единицы. Также, для каждого ряда данных анализа могут быть установлены доверительные интервалы.

В Разделе 3.2. рассматриваются методики анализа, основанные на использовании модели параллельных линий, а в Разделе 3.3. – основанные на использовании модели угловых коэффициентов.

Если хотя бы одно из перечисленных пяти условий (1, 2, 3, 4А, 5А или 1, 2, 3, 4В, 5В) не выполняется, применение приведенных в данной статье методов вычисления не может быть обосновано и следует провести специальный анализ результатов количественного определения.

Аналитик не должен применять другой метод преобразования, до тех пор, пока не убедится, что невыполнение условий является не случайным, а обусловлено систематическим изменением условий испытания. В этом случае, прежде чем принять новое преобразование для постоянных (рутинных) количественных определений, следует повторить исследования, описанные в Разделе 3.1.1.

Высокое число недостоверных результатов анализа, возникающих вследствие непараллельности или нелинейности, при выполнении постоянных (рутинных) количественных определений в результате сравнения подобных материалов, чаще всего свидетельствует о неправильном планировании эксперимента и числа повторений. Обычно это обусловлено недостаточно полной идентификацией всех источников вариации, воздействующих на количественное определение, что в результате может привести к

заниженной оценке неисключенной погрешности и, соответственно, к увеличению *F*-отношений.

В рамках конкретного количественного определения не всегда можно принять во внимание все возможные источники вариации (например, вариация в серии «изо-дня-в-день»). В этом случае доверительные интервалы повторных результатов количественных определений одного и того же препарата могут не совпадать, и следует соблюдать осторожность при оценке отдельных доверительных интервалов. Для того, чтобы получить более надежную оценку доверительного интервала, необходимо выполнить несколько независимых количественных определений, объединить полученные результаты и получить одну оценку активности и доверительный интервал (см. Раздел 6). Для контроля качества постоянных (рутинных) количественных определений рекомендуется результаты оценки угловых коэффициентов и оценки остаточной ошибки заносить в контрольные карты.

- довольно высокая неисключенная (остаточная) погрешность может свидетельствовать об определенной технической проблеме. Эту ситуацию следует проанализировать и, если в ходе выполнения количественного определения выявятся нарушения, определение следует повторить. Необычно высокая неисключенная (остаточная) погрешность также может указывать на наличие случайного выброса или аналогичного результата. Эффект, достоверность которого ставится под сомнение из-за неправильного выполнения количественного определения, следует отбросить. Обоснованным также можно считать отбрасывание аномального эффекта после завершения количественного определения, если удается проследить причину выброса и убедиться, что она обусловлена нарушениями в ходе количественного определения. Произвольное отбрасывание или сохранение очевидных выбросов может оказаться серьезным источником погрешности измерения. В целом не рекомендуется отбрасывать результаты лишь на основании значимости исследования на выбросы.
- Время от времени может возникать довольно низкая неисключенная (остаточная) погрешность, что приводит к тому, что *F*-отношения превышают критические значения. В этом случае может быть оправданным замена неисключенной (остаточной) погрешности отдельного количественного определения на среднюю неисключенную (остаточную) погрешность, полученную на основании архивных данных, зафиксированных в контрольных картах.

3.1.3 ВЫЧИСЛЕНИЯ И ОГРАНИЧЕНИЯ

Согласно общим принципам надлежащего планирования эксперимента на план анализа обычно накладываются следующие три ограничения. Они обеспечивают выигрыш как в простоте вычислений, так и в их точности.

а) число разведений должно быть одинаковым для каждого из тестируемых препаратов;

в) при использовании модели параллельных линий отношение двух последовательных доз должно быть всегда постоянным для всех испытаний; при использовании модели угловых коэффициентов, должна быть постоянной разница (интервал) двух последовательных доз.

с) число тестируемых объектов должно быть одинаковым во всех исследованиях.

Если используемый план удовлетворяет этим условиям, то вычисления упрощаются. Формулы вычислений приведены в Разделах 3.2 и 3.3. Рекомендуется использовать программное обеспечение, разработанное специально для этих целей. Существует ряд статистических программ, при помощи которых можно легко обрабатывать планы количественных определений, приведенные в частных статьях. Не все программы могут использовать одни и те же формулы и алгоритмы, но они все должны приводить к одинаковым результатам.

Планы количественных определений, не отвечающие вышеуказанным требованиям, могут быть также допустимы и корректны. Однако, необходимые для таких вычислений формулы слишком сложны и поэтому в данной статье не приводятся. Краткое описание методов расчета приводится в Разделе 7.1. Эти методы могут также использоваться для ограниченных планов, в этом случае они эквивалентны упрощенным формулам.

Формулы для ограниченных планов, приведенные в данной статье, могут быть использованы, например, для создания специальных программ с использованием электронных таблиц. Для лучшего понимания статистики и проверки правильности результатов таких программ, могут быть использованы примеры, приведенные в Разделе 5.

3.2. МОДЕЛЬ ПАРАЛЛЕЛЬНЫХ ЛИНИЙ

3.2.1 ВВЕДЕНИЕ

На рисунке 3.2.1.-1. показана модель параллельных линий. Логарифмы доз откладывают по оси абсцисс (*x*), таким образом, чтобы их значения возрастали слева направо. Эффекты откладывают по оси ординат (*y*). Конкретные значения эффектов для каждого из исследований показаны в виде черных точек. Две линии представляют собой рассчитанное соотношение «*ln*(доза-эффект)» для стандартного и испытуемого препаратов.

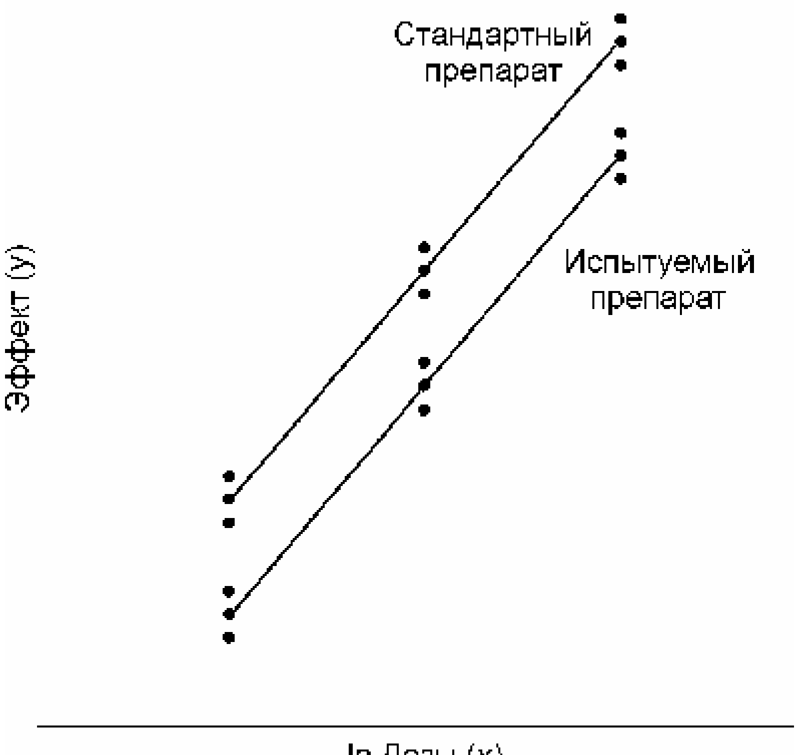


Рисунок 3.2.1.-1. Модель параллельных линий в случае анализа (3+3). Оценка предполагаемой активности испытуемого препарата завышена по отношению к истинной.

Примечание: В данной статье во всех случаях используется натуральный логарифм (*ln* или log_e). Везде, где используется термин «антилогарифм», подразумевается значение e^x. Тем не менее, также можно пользоваться логарифмом Бриггса или десятичным логарифмом (*lg* или log_{10}). В этом случае соответствующий «антилогарифм» равен 10^x.

Для удовлетворительного количественного определения предполагаемая активность испытуемого препарата должна быть близка к действительной активности. Исходя из предполагаемой активности испытуемого препарата и принятой активности стандартного препарата, готовятся разведения с одинаковой (по возможности) активностью, то есть соответствующие дозы стандартного и испытуемого препаратов должны иметь одинаковую активность. Если нет информации о предполагаемой активности, выполняют серию предварительных определений в широком диапазоне доз, для установления области, в которой эта зависимость является линейной.

Чем точнее определена принятая предполагаемая активность испытуемого препарата к принятой активности стандартного препарата, тем ближе одна к одной будут эти линии, поскольку они должны давать одинаковые эффекты при одинаковых дозах. Горизонтальное расстояние между линиями представят собой «истинное» значение активности испытуемого препарата по отношению к его предполагаемой активности. Чем больше расстояние между линиями, тем менее точна предполагаемая активность испытуемого препарата. Если линия, соответствующая испытуемому препарату, смещена вправо от линии, соответствующей стандартному препарату, то оценка предполагаемой активности была завышена и при расчетах оцененная активность будет ниже предполагаемой. Аналогично, если линия, соответствующая испытуемому препарату, расположена слева от линии, соответствующей стандартному препарату, то предполагаемая активность была занижена и при расчетах оцененная активность будет выше предполагаемой.

3.2.2 ПЛАН КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Для оптимизации точности плана анализа будет полезным соблюдение следующих требований:

1) отношение между угловым коэффициентом и неисключенной (остаточной) погрешностью должно как можно бóльшим;
2) диапазон доз должен быть максимально возможным;
3) линии должны располагаться как можно ближе одна к другой, т. е. предполагаемая активность должна с хорошей точностью давать оценку «истинной» активности.

Распределение экспериментальных объектов (животные, пробирки и т.д.) для различных исследований может быть осуществлено разными способами.

3.2.2.1 Схема полной рандомизации

Если вся совокупность экспериментальных объектов представляется достаточно однородной и нет никаких оснований полагать, что разброс результатов будет меньшим внутри определенным образом сформированных подгрупп, распределение объектов в разные группы выполняется случайным образом.

Если объекты в подгруппах единиц, таких как положение в пространстве или дата исследования распределены более однородно, чем вся совокупность в целом, точность количественного определения может быть повышена путем введения в план исследований одного или нескольких ограничений. Тщательно продуманное распределение объектов с использованием этих ограничений позволяет исключить незначимые источники вариации.

3.2.2.2 Схема рандомизированных блоков

В основе этой схемы лежит возможность выделить идентифицируемый источник вариации (например, различная чувствительность у нескольких приплодов экспериментальных животных или различие между чашками Петри в случае микробиологического определения активности методом диффузии). В соответствии с данной схемой каждое исследование должно быть повторено одинаковое число раз в каждом из блоков (приплод или чашка Петри). Данная схема применима только тогда, когда блок достаточно большой для осуществления всех исследований. Пример использования такой схемы приведен в Разделе 5.1.3. Также допускается использовать схемы рандомизированных блоков с повторениями. В пределах каждого блока исследования должны распределяться случайным образом.
В Разделе 8.5. приведен алгоритм, при помощи которого можно получить случайное распределение.

3.2.2.3 Схема латинского квадрата

Данная схема применяется, когда на результат воздействует два различных источника вариации, каждый из которых может характеризоваться *k* различными уровнями или позициями. Например, в случае количественного определения антибиотиков с использованием пластин, исследования могут быть организованы на большой пластине в виде матрицы $k \times k$; причем каждое исследование встречается по одному разу в каждом столбце и в каждой строке. Схема применяется в случае, когда число строк, столбцов и число исследований одинаково. Результаты записываются в виде квадрата, называемого латинским. Вариации, обусловленные различием в результатах между *k* строками и *k* столбцами, могут быть сгруппированы, что позволит уменьшить погрешность. Пример использования схемы латинского квадрата приведен в Разделе 5.1.2. В Разделе 8.6. дан алгоритм для построения латинских квадратов.

3.2.2.4 Перекрестная схема

Данную схему полезно применять, когда эксперимент может быть разделен на блоки, но к каждому блоку возможно применить только два исследования. Например, таким блоком может быть один экспериментальный объект, который может быть протестирован дважды. Данная схема предназначена для повышения точности путем исключения различий результатов между объектами за счет их взаимной компенсации при двух экспериментах с общим уровнем эффекта. Если исследуются две дозы испытуемого и стандартного препаратов, такую схему называют двойной перекрестной схемой.

Эксперимент разбивают на две стадии, разделенные достаточным промежутком времени. Объекты подразделяют на четыре группы, и на первой стадии эксперимента в каждой группе выполняется одно из четырех исследований. Объекты, которые на первой стадии получали один препарат, на второй стадии получают второй препарат. Единицы, которые на первой стадии получали меньшие дозы, на второй стадии получают большие. Распределение доз приведено в Таблице 3.2.2.-I. Пример использования схемы показан в Разделе 5.1.5.

Таблица 3.2.2.-1.

Распределение доз при использовании перекрестной схемы.

Группа единиц	Стадия I	Стадия II
1	S_1	T_2
2	S_2	T_1
3	T_1	S_2
4	T_2	S_1

3.2.3 ДИСПЕРСИОННЫЙ АНАЛИЗ

В данном разделе приведены формулы, которые необходимы при выполнении дисперсионного анализа. В Разделе 5.1. рассмотрены конкретные примеры, позволяющие понять назначение этих формул. Если необходимо, можно также обратиться к терминам и определениям (Раздел 9).

Приведенные формулы пригодны для симметричных количественных определений, в которых один или более испытуемых препаратов (*T, U* и др.) сравниваются со стандартным препаратом (*S*). Следует подчеркнуть, что формулы могут быть использованы только в том случае, если дозы отличаются одна от другой в одинаковое число раз, если каждый из препаратов исследуется одинаковое число раз и если каждое исследование повторяется одинаковое число раз. Если эти условия не выполняются, данные формулы не должны применяться для анализа.

За исключением некоторых уточнений остаточной ошибки, основной статистический анализ данных количественного определения одинаков для схем полной рандомизации, рандомизированных блоков и латинских квадратов. Формулы для перекрестной схемы исследования сильно отличаются и приведены в примере 5.1.5.

Исходя из рассмотренных в разделе 3.1. пунктов и преобразовав, если это необходимо, эффекты, для каждой группы и для каждой дозы препарата следует вычислить среднее значение, как описано в Таблице 3.2.3.-I. Также следует вычислить линейные контрасты, связанные с наклоном прямых «*ln*(доза–эффект)». В таблице 3.2.3.-II. Приведены три дополнительные формулы, которые необходимы для проведения анализа.

Суммарная вариация результатов, вызванная различными препаратами, подразделяется далее, как описано в Таблице 3.2.3.-3; сумму квадратов при этом рассчитывают с использованием данных из Таблиц 3.2.3.-1. и 3.2.3.-2. Сумма квадратов, обусловленная нелинейностью, может быть рассчитана только в том случае, если при количественном определении использовались, по крайней мере, по три дозы каждого из препаратов.

Неисключенная погрешность количественного определения рассчитывается путем вычитания вариации, обусловленной схемой рандомизации эксперимента, из общей вариации для эффекта (Таблица 3.2.3.-4). В этой таблице $\bar{y}$ - среднее значение всех результатов, полученных при количественном определении. Следует заметить, что для латинского квадрата число повторных результатов (*n*) равно числу строк, столбцов и видов воздействий (*dh*).

Дисперсионный анализ завершают следующим образом. Находят дисперсию (средний квадрат отклонения) путем деления каждой суммы квадратов на соответствующее число степеней свободы. Далее оценивают статистическую значимость отношения дисперсии для каждой переменной к неисключенной (остаточной) погрешности

(s^2) (так называемое F-отношение). Для чего можно использовать Таблицу 8.1 или соответствующую подпрограмму компьютерного программного обеспечения.

Таблица 3.2.3.-1.

Формулы для количественных определений с дозами каждого из препаратов, при использовании модели параллельных линий.

	Стандартный препарат (S)	1-й испытуемый препарат (T)	2-й испытуемый препарат (U, и т.д.)
Средний эффект от минимальной дозы	S_1	T_1	U_1
Средний эффект от второй дозы	S_2	T_2	U_2
...	...	...	...
Средний эффект от максимальной дозы	S_d	T_d	U_d
Суммарный эффект препарата	$P_S = S_1 + S_2 + ... + S_d$	$P_T = T_1 + T_2 + ... + T_d$	$P_U = ...ит.д.$
Линейный контраст	$L_S = 1S_1 + 2S_2 + ... + dS_d \pm \frac{1}{2}(d+1)P_S$	$L_T = 1T_1 + 2T_2 + ... + dT_d \pm \frac{1}{2}(d+1)P_T$	$L_U = ...ит.д.$

Таблица 3.2.3.-2.

Дополнительные формулы для дисперсионного анализа

$H_P = \frac{n}{d}$	$H_L = \frac{12n}{d^3 - d}$	$K = \frac{n(P_S + P_T + ...)^2}{hd}$

Таблица 3.2.3.-3.

Формулы для расчета суммы квадратов и степеней свободы

Источник вариации (размаха)	Степени свободы (f)	Сумма квадратов
Препараты	h-1	$SS_{prep} = H_P(P_S^2 + P_T^2 + ...) - K$
Линейная регрессия	1	$SS_{reg} = \frac{1}{h}H_L(L_S^2 + L_T^2 + ...)^2$
Непараллельность	h-1	$SS_{par} = H_L(L_S^2 + L_T^2 + ...) - SS_{reg}$
Нелинейность(*)	$h(d$-2)	$SS_{lin} = SS_{treat} - SS_{prep} - SS_{reg} - S$
Группы	hd-1	$SS_{treat} = n(S_1^2 + ... + S_d^2 + T_1^2 + ... +$
(*) Не рассчитывается для двухдозовых количественных определений		

Таблица 3.2.3.-4.

Оценка неисключенной погрешности

Источник вариаций	Степени свободы	Сумма квадратов
Блоки (строки)(*)	n-1	$SS_{block} = hd(R_1^2 + ... + R_n^2) - K$
Столбцы(**)	n-1	$SS_{col} = hd(C_1^2 + ... + C_n^2) - K$
Неисключенная погрешность(***): Полная рандомизация	$hd(n$-1)	$SS_{res} = SS_{tot} - SS_{treat}$
Неисключенная погрешность(***): Рандомизированный блок	(hd-1)(n-1)	$SS_{res} = SS_{tot} - SS_{treat} - SS_{block}$
Неисключенная погрешность(***): Латинский квадрат	(hd-2)(n-1)	$SS_{res} = SS_{tot} - SS_{treat} - SS_{block} - SS_{co}$
Общая вариация	nhd-1	$SS_{tot} = \sum (y - \bar{y})^2$

(*) Не рассчитывается для схемы полной рандомизации.
(**)Рассчитывается только для схемы Латинских квадратов.
(***)Зависит от схемы количественного определения.

3.2.4 ИССЛЕДОВАНИЯ ДОСТОВЕРНОСТИ

Результаты количественного определения считаются «статистически значимыми», если выполняются следующие условия:

1) проведенные вычисления свидетельствуют о значимости линейной регрессии, т. е. рассчитанная вероятность меньше 0,05. Если это условие не выполняется, вычислить доверительный интервал с вероятностью 95% не представляется возможным;
2) проведенные вычисления свидетельствуют, что непараллельность незначима, т. е. рассчитанная вероятность ≥0,05. Это означает, что условие 5А (Раздел 3.1) выполняется.
3) Проведенные вычисления свидетельствуют, что нелинейность незначима, т.е. рассчитанная вероятность ≥0,05. Это означает, что условие 4А (Раздел 3.1) выполняется.

Существенное отклонение от параллельности при многократных количественных определениях может быть обусловлено тем, что угловой коэффициент зависимости «*ln*(доза–эффект)» для одного из препаратов, включенных в исследование, отличается от аналогичного значения для других препаратов. В этом случае допускается не признавать несостоятельность всего анализа, а исключить результаты, имеющие отношение к этому препарату, и повторить статистический анализ заново.

После того, как установлена статистическая значимость, могут быть рассчитаны оценки активности препаратов и границы доверительных интервалов при помощи приведенных в следующем разделе методов.

3.2.5 ОЦЕНКА АКТИВНОСТИ И ГРАНИЦ ДОВЕРИТЕЛЬНЫХ ИНТЕРВАЛОВ

Если обозначить через I натуральный логарифм отношения между ближайшими значениями доз любого из препаратов, то общий для всех прямых угловой коэффициент (b) в случае количественного определения, которое включает d доз для каждого препарата, вычисляется по формуле:

$$b=\frac{H_L(L_S+L_T+...)}{Inh} \qquad (3.2.5.-1)$$

Логарифм отношения активности испытуемого препарата, например *T*, вычисляют по формуле:

$$M_T^{'}=\frac{P_T-P_S}{db} \qquad (3.2.5.-2)$$

Рассчитанная активность представляет собой оценку «истинной активности» каждого из испытуемых препаратов. Границы доверительного интервала могут быть рассчитаны, как антилогарифм выражения:

$$CM_T^{'}\pm\sqrt{(C-1)(CM_T^{'2}+2V)} \qquad (3.2.5.-3)$$

где:

$$C=\frac{SS_{reg}}{SS_{reg}-s^2t^2},$$

$$V=\frac{SS_{reg}}{b^2dn}$$

Значение *t* может быть найдено из Таблицы 8.2. при p=0,05 и числе степеней свободы, равному числу степеней свободы неисключенной (остаточной) погрешности. Оценка активности (R_T) и соответствующий доверительный интервал вычисляют путем умножения результатов на величину A_T после антилогарифмирования. Если выяснится, что активности исходных растворов, приготовленных исходя из предполагаемой и принятой активностей, не равны между собой, следует ввести поправочный коэффициент (см. примеры 5.1.2 и 5.1.3).

3.2.6 ПРОПУЩЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

В случае сбалансированного количественного определения существует вероятность случайной потери одного или нескольких результатов, абсолютно не связанных с процедурой количественного определения, например, вследствие смерти животного. Если будет доказано, что смерть животного никоим образом не связана с составом введенного препарата, возможность выполнения точных расчетов остается, но формулы значительно усложняются и могут быть представлены только в рамках общих линейных моделей (см. Раздел 7.1). Тем не менее, существует приблизительный метод в котором простота сбалансированного плана сохраняется путем замены потерянного результата рассчитанным значением. Потерю информации, которая при этом имеет место, сохраняют следующим образом: число степеней свободы для общей суммы квадратов и для неисключенной (остаточной) погрешности уменьшают на число потерянных результатов, а для вычисления отсутствующих значений используют одну из приведенных ниже формул. Следует иметь ввиду, что этот метод является приблизительным, и предпочтения следует отдавать точным расчетам.

Если потеряно более одного результата, могут быть использованы эти же формулы. В этом случае для всех потерянных значений, кроме одного, проводят грубые оценки. Для этого значения вычисляют при помощи соответствующей формулы с учетом всех данных, включая сделанные предположения. Эти рассчитанные значения

включают в общий массив данных и аналогичным образом проводят вычисление значений для первой из грубых оценок. После вычисления всех потерянных значений повторяют весь цикл сначала, используя более точные приближения или рассчитанные значения для каждого результата, для которого применялась формула. Такой цикл вычислений повторяют до тех пор, пока два последовательных цикла не дадут те же самые значения. Обычно сходимость достигается очень быстро.

При условии, что число замененных результатов невелико по отношению к общему числу данных в эксперименте (например, меньше 5%), приближения, предполагаемые при этих заменах и уменьшение степеней свободы на число потерянных данных, замененных таким образом, обычно являются удовлетворительными. Полученные результаты следует интерпретировать с большой осторожностью, особенно если имеются пропущенные результаты в одном исследовании или блоке. В случае неясностей, либо непредвиденных ситуациях следует проконсультироваться со специалистом по биостатистике. Категорически недопустима замена пропущенных результатов в случае испытаний без повторений.

Схема полной рандомизации

В данном случае пропущенное значение может быть заменено средним арифметическим всех других результатов в пределах одной группы.

Схема рандомизированных блоков

Потерянный результат заменяют величиной y', рассчитанной по формуле:

$$y' = \frac{nB' + kT' - G'}{(n-1)(k-1)} \qquad (3.2.6.\text{-}1)$$

где B' – сумма результатов для блока, содержащего потерянное значение, T' – соответствующее общее количество препаратов, G' – сумма всех результатов, полученных при количественном определении.

Схема латинских квадратов

Пропущенное значение y' рассчитывают по формуле:

$$y' = \frac{k(B' + C' + T') - 2G'}{(k-1)(k-2)} \qquad (3.2.6.\text{-}2)$$

где:
B' и C' – суммы результатов, соответственно, в строках и столбцах, содержащих потерянные данные. В данном случае $k=n$.

Перекрестная схема

Если при использовании перекрестной схемы результат был случайно потерян, следует обратиться к пособию по статистике (например, к руководству D.J.Finney, см. Раздел 10), поскольку применение той или иной формулы зависит от конкретной комбинации исследований.

3.3. МОДЕЛЬ УГЛОВЫХ КОЭФФИЦИЕНТОВ

3.3.1 ВВЕДЕНИЕ

Данная модель может применяться, например, для некоторых микробиологических количественных определений, в которых независимая переменная представляет собой концентрацию эссенциального фактора роста для микроорганизмов в среде ниже оптимальной для роста концентрации. На Рисунке 3.3.1.-1. показана модель угловых коэффициентов.

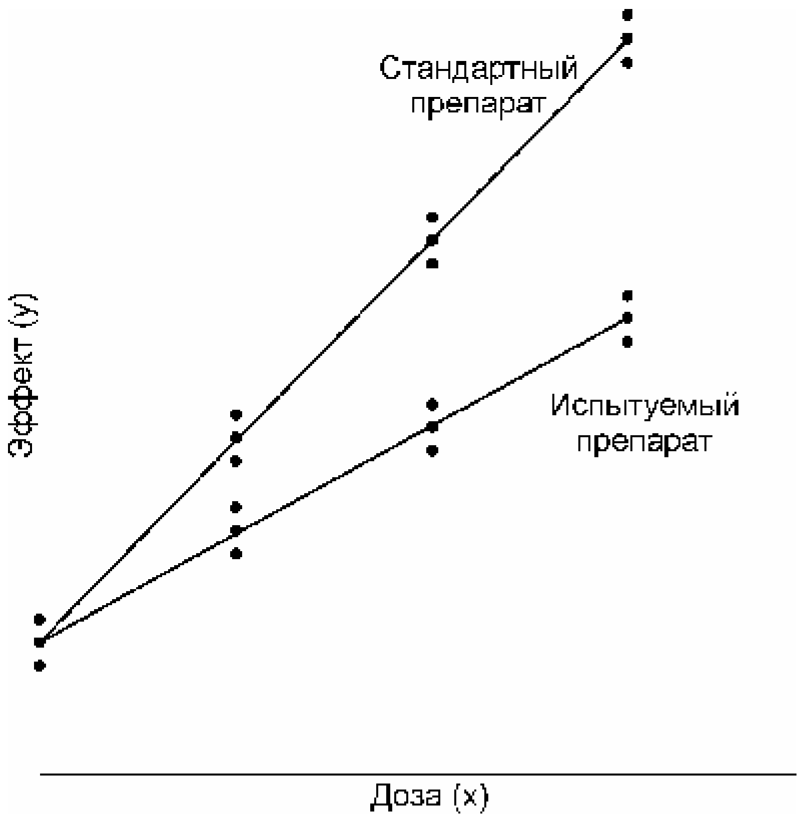


Рисунок 3.3.1.-1. *Модель угловых коэффициентов для количественного определения 2´3+1. Оценка предполагаемой активности испытуемого препарата завышена по отношению к истинной.*

По горизонтальной оси абсцисс откладываются значения доз, начало оси координат соответствует нулевой дозе; значения доз возрастают слева направо. По вертикальной оси ординат откладываются полученные эффекты. Индивидуальный результат каждого исследования показан в виде черной точки. Две линии представляют собой зависимости доза – эффект, рассчитанные для стандартного и испытуемого препаратов, исходя из предположения, что они пересекаются друг с другом в точке, соответствующей нулевой дозе. В отличие от модели параллельных линий, значения доз не представляются в виде логарифмов.

Так же, как и в случае количественных определений, основанных на модели параллельных линий, важно, чтобы предполагаемая активность была как можно ближе к истинной и, если возможно, желательно приготовить разведения испытуемого и стандартного препаратов с одинаковыми активностями. Чем точнее будет предполагаемая активность, тем ближе линии будут располагаться одна к одной. Отношение угловых коэффициентов представляет собой отношение «истинного» значения активности испытуемого препарата к его предполагаемой активности. Если угол наклона линии ис-

пытуемого препарата больше угла наклона линии стандартного препарата, это означает, что активность была занижена и при расчетах оцененная активность будет выше предполагаемой активности. Аналогично, если угол наклона линии испытуемого препарата меньше угла наклона линии стандартного препарата, то активность была завышена, и расчеты покажут, что оцененная активность будет ниже предполагаемой.

В ходе эксперимента, все результаты следует проверить на выполнение условий 1, 2 и 3, приведенных в Разделе 3.1. Процедура проведения дисперсионного анализа описана в Разделе 3.3.3, таким образом, он предполагает возможность проверки выполнения условий 4В и 5В, приведенных в Разделе 3.1.

3.3.2 ПЛАН КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Использование методов статистического анализа, приведенных в данном разделе, накладывает на количественные определения следующие ограничения:

a) как стандартный, так и испытуемый препараты должны анализироваться при одинаковом числе равновеликих разведений;
b) возможно наличие дополнительной группы экспериментальных объектов, которым не вводят препарат (плацебо группа);
c) во всех группах должно быть одинаковое число экспериментальных объектов.

Как уже было отмечено в Разделе 3.1.3, планы количественных определений, которые не отвечают требованиям этих ограничений, могут быть также корректными и обоснованными. Однако, описанные здесь простые методы статистического анализа, в данном случае неприменимы, и следует либо обратиться за помощью к специалисту, либо использовать соответствующее программное обеспечение.

Обычно предпочтительным является использование плана исследования с двумя дозами каждого препарата и одной плацебо группой. Так называемая «(*2h+1*) точечная схема с общей нулевой точкой», которая обеспечивает очень высокую точность наряду с возможностью проверки достоверности ограничений, упомянутых выше. Однако, не всегда может допускаться линейность зависимостей вплоть до нулевой дозы. Если допускается небольшая потеря точности, можно использовать план, который не предполагает проведение плацебо исследования. В этом случае предпочтительно использовать по три дозы каждого препарата, «(*3h*) точечная схема с общей нулевой точкой». Эти дозы назначаются следующим образом:

1) стандартный препарат вводится в максимальной дозе, которая должна быть близка к наивысшей дозе, воспроизводящей средний эффект на линейном отрезке зависимости «доза – эффект», но не превышать ее;
2) Две другие дозы равномерно распределяются в промежутке между максимальной и нулевой дозами;
3) Испытуемый препарат вводится в соответствующих дозах, определенных исходя из предполагаемой активности вещества.

Возможно использование схем полной рандомизации, рандомизированных блоков или латинских квадратов, описанные в Разделе 3.2.2. Так же, как и для модели параллельных линий, использование любой из этих схем требует корректировки ошибки суммы квадратов. Ниже описана схема анализа в случае, если со стандартным препаратом сравнивается один или несколько испытуемых препаратов.

3.3.3 ДИСПЕРСИОННЫЙ АНАЛИЗ

3.3.3.1 (*hd+1*)-схема

Результаты проверяют согласно требованиям, описанным в Разделе 3.1 и, если необходимо, проводят их преобразование. Затем для каждого эксперимента и каждого препарата вычисляют среднее значение, как описано в Таблице 3.3.3.1-I. Дополнительно рассчитывают среднее значение для плацебо исследований (*B*).

В Таблицах 3.3.3.1.-1 – 3.3.3.1.-3 приведен расчет суммы квадратов для дисперсионного анализа. Сумма квадратов, обусловленная нелинейностью, может быть рассчитана только в том случае, если в план количественного определения было включено, по крайней мере, по три дозы каждого из препаратов. Неисключенную (остаточную) погрешность находят путем вычитания вариации, предусмотренной планом эксперимента, из общей вариации для результата исследования (Таблица 3.3.3.1.-IV).

Далее дисперсионный анализ завершают следующим образом: каждую сумму квадратов отклонений делят на соответствующее число степеней свободы для вычисления дисперсии (среднего квадрата отклонений). Затем оценивают значимость отношения дисперсии (среднего квадрата отклонений) для каждой переменной к неисключенной (остаточной) погрешности (s^2) (*F*-отношение). Для этого можно воспользоваться Таблицей 8.1 или соответствующей подпрограммой компьютерного программного обеспечения.

Таблица 3.3.3.1.-1.

Формулы для d-дозовых количественных определений с использованием модели угловых коэффициентов для каждого препарата и плацебо испытания.

	Стандартный препарат (S)	1-й испытуемы препарат (T)	2-й испытуемый препарат (U, и т.д.)
Среднее значение для минимальной дозы	S_1	T_1	U_1
Среднее значение для второй дозы	S_2	T_2	U_2
…	…	…	…
Среднее значение для максимальной дозы	S_d	T_d	U_d
Суммарный результат для препарата	$P_S = S_1 + S_2 + ... + S_d$	$P_T = T_1 + T_2 + ... + T_d$	$P_U = ...$
Линейное произведение	$L_S = 1S_1 + 2S_2 + ... + dS_d$	$L_T = 1T_1 + 2T_2 + ... + dT_d$	$L_U = ...$
Точка пересечения	$a_S = (4d+2)P_S - 6L_S$	$a_T = (4d+2)P_T - 6L_T$	$a_U =$
Угловой коэффициент	$b_S = 2L_S - (d+1)P_S$	$b_T = 2L_T - (d+1)P_T$	$b_U =$
Значения для групп	$G_S = S_1^2 + ... + S_d^2$	$G_T = T_1^2 + ... + T_d^2$	$G_U =$
Нелинейность(*)	$J_S = G_S - \frac{P_S^2}{d} - \frac{3b_S^2}{d^3 - d}$	$J_T = G_T - \frac{P_T^2}{d} - \frac{3b_T^2}{d^3 - d}$	$J_U =$
(*) не рассчитывается для двухдозовых количественных определений			

Таблица 3.3.3.1.-2.

Дополнительные формулы для проведения дисперсионного анализа

$H_B = \frac{nhd^2 - nhd}{hd^2 - hd + 4d + 2}$	$H_I = \frac{n}{4d^3 - 2d^2 - 2d}$	$a = \frac{a_S + a_T + ...}{h(d^2 - d)}$	$K = \frac{n(B + P_S + P_T + ...)^2}{hd + 1}$

Таблица 3.3.3.1.-3.

Формулы для расчета сумм квадратов и степеней свободы

Источник вариаций	Степени свободы (*f*)	Сумма квадратов
Регрессия	*h*	$SS_{reg} = SS_{treat} - SS_{blank} - SS_{\text{int}} - SS_{lin}$
Плацебо исследования	1	$SS_{blank} = H_B(B - a)^2$
Точка пересечения	*h*-1	$SS_{\text{int}} = H_I(a_S^2 + a_T^2 + ...) - h(d_2 - d)^2 a^2)$
Нелинейность(*)	*h(d-2)*	$SS_{lin} = n(J_S + J_T + ...)$
Группы	*hd*	$SS_{treat} = n(B^2 + G_S + G_T + ...) - K$
(*) Не рассчитывается для двухдозовых количественных определений		

Таблица 3.3.3.1.-4.

Оценка неисключенной (остаточной) погрешности

Источник вариаций		Степени свободы	Сумма квадратов
Блоки (строки)(*)		*n*-1	$SS_{block} = hd(R_1^2 + ... + R_n^2) - K$
Столбцы(**)		*n*-1	$SS_{col} = hd(C_1^2 + ... + C_n^2) - K$
Неисключенная погрешность(***)	Полная рандомизация	(*hd*+1)(*n*-1)	$SS_{res} = SS_{tot} - SS_{treat}$
	Рандомизированный блок	*hd*(*n*-1)	$SS_{res} = SS_{tot} - SS_{treat} - SS_{block}$
	Латинский квадрат	(*hd*-1)(*n*-1)	$SS_{res} = SS_{tot} - SS_{treat} - SS_{block} - SS_{col}$
Общая вариация		*nhd+n-1*	$SS_{tot} = \sum(y - \bar{y})^2$

(*) Не рассчитывается для схемы полной рандомизации.
(**) Рассчитывается только для схемы Латинских квадратов.
(***) Зависит от схемы количественного определения.
R – значения эффекта по строкам
C – значения эффекта по столбцам

3.3.3.2 (*hd*)-схема

Для этой схемы используются, в основном, те же самые формулы, что и для (*hd+1*)-схемы, за исключением некоторых небольших различий:

- переменная *B* исключается из всех формул.

- Значение *K* рассчитывается как $K = \frac{n(P_S + P_T + ...)^2}{hd}$
- SS_{blank} исключается из дисперсионного анализа.
- Число степеней свободы для вариаций, обусловленных группами равно *hd-1*.
- Число степеней свободы для неисключенной (остаточной) погрешности и общей вариации рассчитывают, как описано для модели параллельных линий (см. Таблицу 3.2.3.-IV).

Обоснованность (достоверность) количественного определения, активность и границы доверительного интервала определяют, как описано в Разделах 3.3.4 и 3.3.5.

3.3.4 ИССЛЕДОВАНИЯ ДОСТОВЕРНОСТИ

Результаты количественного определения считаются «статистически значимыми», если результаты, полученные при дисперсионном анализе, удовлетворяют следующим условиям:

1) Вариация, обусловленная плацебо в (hd+1)-схеме, не является статистически значимой, т.е. рассчитанная вероятность ≥0.05. Это означает, что результаты, полученные при плацебо исследовании, не существенно отличаются от общей точки пересечения и линейная зависимость сохраняется вплоть до нулевой дозы.
2) Вариация, связанная с точкой пересечения, не является значимой, т.е. рассчитанная вероятность ≥0.05. Это означает, что выполняется условие 5B, Раздел 3.1.
3) В количественном определении, которое включает, по крайней мере, по три дозы для каждого из препаратов, вариация, обусловленная нелинейностью, не является значимой, т.е. рассчитанная вероятность ≥0.05. Это означает, что выполняется условие 4B, Раздел 3.1.

Статистически значимая вариация, обусловленная проведением плацебо исследования, свидетельствует о том, что предположение о линейности не подтверждается для диапазона доз возле нулевой точки. Если это отклонение носит скорее систематический, чем случайный характер, наиболее подходящей является (*hd*)-схема. При этом любые результаты, связанные с плацебо исследованиями, должны быть исключены.

Если все выполненные исследования свидетельствуют о достоверности (обоснованности) количественного определения, активность и границы доверительного интервала рассчитываются, как описано в Разделе 3.3.5.

3.3.5 ОЦЕНКА АКТИВНОСТИ И ГРАНИЦ ДОВЕРИТЕЛЬНОГО ИНТЕРВАЛА

3.3.5.1 (*hd+1*)-схема

Общая точка пересечения a’ для препаратов может быть вычислена по формуле:

$$a' = \frac{(2d+1)B + (2d-3)ha}{h(2d-3) + 2d + 1} \qquad (3.3.5.1.\text{-}1)$$

угловой коэффициент для стандартного препарата и, аналогично, для каждого из других препаратов, рассчитывают по формуле:

$$b'_S = \frac{6L_S - 3d(d+1)a'}{2d^3 + 3d^2 + d} \qquad (3.3.5.1.\text{-}2)$$

Отношение активностей для каждого из препаратов, теперь может быть рассчитано следующим образом:

$$R'_T = \frac{b'_T}{b'_S} \qquad (3.3.5.1.-3)$$

Для определения рассчитанной активности R_T, полученное значение нужно умножить на предполагаемую активность A_T испытуемого препарата. Если интервал между дозами стандартного и испытуемого препаратов не был одинаковым, активность следует умножить на величину I_S/I_T. Обратите внимание, что в отличие от модели параллельных линий, антилогарифмы при этом не вычисляются.

Доверительный интервал для переменной R'_T вычисляется по формуле:

$$CR'_T - K' \pm \sqrt{(C-1)(CR'^2_T + 1) + K'(K' - 2CR'_T)} \qquad (3.3.5.1.-4)$$

где:

$C = \dfrac{b'^2_S}{b'^2_S - s^2 t^2 V_1}$ и

$K' = (C-1)V_2$

V_1 и V_2 связаны с дисперсией и ковариацией числителя и знаменателя R'_T. Их рассчитывают по формулам:

$$V_1 = \frac{6}{n(2d+1)}\left(\frac{1}{d(d+1)} + \frac{3}{2(2d+1) + hd(d-1)}\right) \qquad (3.3.5.1.-5)$$

$$V_2 = \frac{3d(d+1)}{(3d+1)(d+2) + hd(d-1)} \qquad (3.3.5.1.-6)$$

Доверительный интервал умножается на величину A_T и, если необходимо, на величину I_S/I_T.

3.3.5.2 (*hd*)-схема

Для этой схемы используются те же формулы, что и для (*hd*+*1*)-схемы за исключением следующих изменений:

$$a' = a \qquad (3.3.5.2.-1)$$

$$V_1 = \frac{6}{n(2d+1)}\left(\frac{1}{d(d+1)} + \frac{3}{h(d-1)}\right) \qquad (3.3.5.2.-2)$$

$$V_2 = \frac{3d(d+1)}{(3d+1) + h(d-1)} \qquad (3.3.5.2.-3)$$

4. ТЕСТЫ С АЛЬТЕРНАТИВНЫМ ТИПОМ ЭФФЕКТА

4.1. ВВЕДЕНИЕ

В ряде случаев невозможно или слишком трудоемко количественно оценить эффект для каждого экспериментального объекта. В то же время, такие результаты, как смерть или симптомы гипогликемии, могут либо наступить, либо не возникать у ка-

ждого из экспериментальных объектов, и общий итог будет зависеть от количества объектов, для которых такой результат наступил. Такой тип исследования называется количественным определением с альтернативными (дискретными) результатами или количественным определением типа «все или ничего».

Ситуация при этом в целом очень похожа на описанную в Разделе 3.1, но вместо *n* различных результатов для каждой группы, записывают одно значение, т.е. процент объектов в каждой испытуемой группе, у которых проявился эффект. Если эти результаты представить в виде графика зависимости доли прореагировавших объектов от логарифма дозы, получим не линейную, а сигмоидную кривую (s-образной формы). Для анализа сигмоидной кривой «доза-эффект» применяют математическую функцию, описывающую данную кривую. Обычно используют кумулятивную функцию нормального распределения (характеристическую кривую). Эта функция имеет преимущества с теоретической точки зрения и, очевидно, является предпочтительной, если результат отражает толерантность экспериментальных объектов. Если результаты связаны с процессами роста, предпочтительной является логистическая функция распределения, хотя различие в результатах, полученных при использовании этих двух функций, как правило, незначительно.

Максимальная достоверность оценки угловых коэффициентов и расположения кривых может быть достигнута только при использовании итерационных процедур. Существует множество таких процедур, которые приводят к одинаковым результатам, но отличаются по эффективности вследствие разной скорости конвергенции. Одним из наиболее быстрых методов является метод прямой оптимизации функции максимальной правдоподобности (см. Раздел 7.1). Этот метод можно легко реализовать при помощи компьютерного программного обеспечения, имеющего соответствующую встроенную подпрограмму.

К сожалению, большинство этих процедур не дают оценки границ доверительного интервала, а методики их вычисления слишком сложны для рассмотрения в данном разделе. Методика, приведенная ниже, не является самой быстрой, но достаточно проста по сравнению с другими методиками. Эта методика может применяться для количественных определений, в которых дин или более испытуемых препаратов сравниваются со стандартным препаратом. Кроме этого, должны выполняться следующие условия:

1) Зависимость между логарифмом дозы и полученным результатом должна быть представлена в виде кумулятивной кривой нормального распределения (характеристическая кривая);
2) Кривые для стандартного и испытуемого препаратов должны быть параллельны, т.е. иметь одинаковую форму, и могут различаться только расположением по оси абсцисс;
3) Теоретически, не должно наблюдаться эффекта от введения чрезвычайно малой дозы, и невозможно отсутствие эффекта от введения чрезвычайно большой дозы.

4.2. МЕТОД ПРОБИТ-АНАЛИЗА

Сигмоидную кривую можно преобразовать в прямую линию путем замены каждого эффекта (т.е. доли объектов у которых появился эффект) в группе соответствующими значениями нормального эквивалентного отклонения от среднего эффекта. Эти

значения, часто называемые «нормиты»[4], теоретически находятся в интервале от +∞ до -∞. Ранее было принято к каждому «нормиту» прибавлять число 5, таким образом, получали так называемые «пробиты»[5]. Это облегчало проведение расчетов вручную, потому что в этом случае исключались отрицательные результаты. С появлением компьютеров необходимость в прибавлении 5 отпала. Поэтому метод, описываемый ниже, правильнее было бы назвать «метод нормит-анализа». Однако, поскольку термин «метод пробит-анализа» широко распространен и используется в литературе, он сохраняется в данной статье исходя из исторических соображений.

На первый взгляд кажется, что после линеаризации результатов следует применять метод параллельных линий, описанный в Разделе 3.2. Однако, это не так, поскольку для каждой дозы не выполняется условие однородности дисперсий. Дисперсия минимальна, если нормит равен нулю и возрастает, как для позитивных, так и для негативных значений нормита. Следовательно, необходимо придать больший вес значениям в средней части кривой, и меньший ее крайним частям. Ниже приведено описание такого метода, а также процедура дисперсионного анализа, оценка активности и границ доверительного интервала.

4.2.1 ПОДГОТОВКА РАБОЧИХ ТАБЛИЦ РЕЗУЛЬТАТОВ

В таблицу 4.2.1.-1 заносятся данные по столбцам, номера которых обозначают следующее:

(1) Доза (D) стандартного или испытуемого препарата;

(2) Число *n* объектов, подвергшихся исследованию;

(3) Число *r* объектов у которых получен позитивный эффект в ходе исследования;

(4) Логарифм *x* дозы;

(5) Доля позитивных эффектов $p=r/n$ в группе;

Далее начинается первый цикл

(6) Столбец Y при первой итерации заполняют нулями;

(7) Соответствующие значения $\Phi=\Phi(Y)$ функции кумулятивного стандартного (характеристической кривой) распределения (см. также Таблицу 8.4);

Значения, заносимые в столбцы (8)-(10) вычисляют по формулам:

$$(8)\quad Z=\frac{e^{-Y2}/2}{\sqrt{2\pi}} \qquad (4.2.1.\text{-}1)$$

$$(9)\quad y=Y+\frac{p-\Phi}{Z} \qquad (4.2.1.\text{-}2)$$

$$(10)\quad \omega=\frac{nZ^2}{\Phi-\Phi^2} \qquad (4.2.1.\text{-}3)$$

Значения ω_x, ω_y, ω_{x^2}, ω_{y^2} и ω_{xy}, заносимые в столбцы с (11) по (15) можно легко вычислить при помощи данных, находящихся в столбцах (4), (9) и (10), затем вычисляют сумму (Σ)этих значений для каждого из препаратов.

---

[4] от англ. «normality unit»

[5] от англ. «probability unit»

Таблица 4.2.1.-1.

Первая рабочая таблица

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	(13)	(14)	(15)
	D	*n*	*r*	*x*	*p*	*Y*	*Φ*	*Z*	*y*	*w*	*wx*	*wy*	wx^2	wy^2	*wxy*
S	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . . Σ =	. . . Σ =	. . . Σ =	. . . Σ =	. . . Σ =	. . . Σ =
T	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . .	. . . Σ =	. . . Σ =	. . . Σ =	. . . Σ =	. . . Σ =	. . . Σ =
и т.д.															

Таблица 4.2.1.-2.

Вторая рабочая таблица

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)
	Σω	Σωx	Σωy	$\Sigma\omega x^2$	$\Sigma\omega y^2$	Σωxy	S_{xx}	S_{xy}	S_{yy}	$\bar{x}$	$\bar{y}$	a
S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
и т.д.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
							Σ =	Σ =				

Полученные результаты суммирования переносят из Таблицы 4.2.1.-1 в столбцы (1)-(6) таблицы 4.2.1.-2, значения, заносимые в остальные стобцы, вычисляют следующим оразом:

$$(7)\ S_{xx} = \sum \omega x^2 - \frac{\left(\sum \omega x\right)^2}{\sum \omega} \qquad (4.2.1.\text{-}4)$$

$$(8)\ S_{xy} = \sum \omega xy - \frac{\left(\sum \omega x\right)\left(\sum \omega y\right)}{\sum \omega} \qquad (4.2.1.\text{-}5)$$

$$(9)\ S_{xy} = \sum \omega y^2 - \frac{\left(\sum \omega y\right)^2}{\sum \omega} \qquad (4.2.1.\text{-}6)$$

$$(10)\ \bar{x} = \frac{\sum \omega x}{\sum \omega} \qquad (4.2.1.\text{-}7)$$

$$(11)\ \bar{y} = \frac{\sum \omega y}{\sum \omega} \qquad (4.2.1.\text{-}8)$$

Теперь можно вычислить общий угловой коэффициент *b* спрямленной характеристической кривой:

$$b = \frac{\sum S_{xy}}{\sum S_{xx}} \qquad (4.2.1.\text{-}9)$$

Точку пересечения *a* с осью ординат определяют одинаково как для стандартного, так и для испытуемого препаратов:

$$a = \bar{y} - b\bar{x} \qquad (4.2.1.\text{-}10)$$

Значения, приведенные в столбце (6) первой рабочей таблицы, теперь заменяют на значения *Y=a+bx*, и повторяют цикл вычислений до тех пор, пока разница между двумя последовательными циклами не станет достаточной маленькой (например, максимальная разница *Y* между двумя соседними циклами будет меньше 10^{-8}).

4.2.2 ИССЛЕДОВАНИЯ ДОСТОВЕРНОСТИ

Перед тем, как начать вычисление активностей и границ доверительных интервалов следует оценить достоверность (обоснованность) количественного определения. Если для каждого из препаратов было проведено по три исследования, то отклонение от линейности может быть рассчитано следующим образом: к Таблице 4.2.1.-2 добавляют тринадцатый столбец и заполняют значениями

$$S_{yy} = \frac{S_{xy}^2}{S_{xx}} \qquad (4.2.2.\text{-}1)$$

Суммарное значение данных этого столбца является мерой отклонения от линейности и приблизительно подчиняется χ^2-распределению со степенями свободы равными *N-2h*. Значимость этой величины можно оценить при помощи Таблицы 8.3 или соответствующей подпрограммы компьютерног программного обеспечения. Если при уровне вероятности 0,05 рассчитанная величина является значимой, количественное определение следует отклонить (см. Раздел 4.2.4).

Если не выявлено зачимого отклонения от линейной регрессии, проверяют отклонение от паралельности при уровне значимости 0,05, для чего рассчитывают значение при числе степеней свободы, равном *h-1*.

$$\chi^2 = \sum \frac{S_{xy}^2}{S_{xx}} - \frac{\left(\sum S_{xy}\right)^2}{\sum S_{xx}} \qquad (4.2.2.\text{-}2)$$

4.2.3 ОЦЕНКА АКТИВНОСТИ И ГРАНИЦ ДОВЕРИТЕЛЬНОГО ИНТЕРВАЛА

Если нет никаких признаков значительного отклонения от линейности и параллельности, вычисляют натуральный логарифм отношения активностей M_T' по формуле:

$$M_T' = \frac{a_T - a_S}{b} \qquad (4.2.3.\text{-}1)$$

Вычисляют антилогарифм этого значения. Далее приняв значения *t=1,96* и *s=1,* рассчитывают границы доверительного интервала как антилогарифм значения:

$$CM_T' - (C-1)(\bar{x}_S - \bar{x}_T) \pm \sqrt{(C-1)(V\sum S_{xx} + C(M_T' - \bar{x}_S + \bar{x}_T)^2)} \qquad (4.2.3.\text{-}2)$$

где :

$$C = \frac{b^2 \sum S_{xx}}{b^2 \sum S_{xx} - s^2 t^2}, \text{ а}$$

$$V = \frac{1}{\sum_S \omega} + \frac{1}{\sum_T \omega}$$

4.2.4 НЕДЕЙСТВИТЕЛЬНЫЕ КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Если отклонения от линейности, описанные в Разделе 4.2.2, являются статистически значимыми, результаты количественного определения обычно признают несостоятельными. Если существуют основания для сохранения количественного определения, формулы существенно изменяются. Величину *t* берут равной *t*-значению (p=0.05) с тем же числом степеней свободы, которое использовалось при проверке линейности. Значение s^2 берут равным значению c^2, деленному на то же число степеней свободы (обычно это значение больше 1).

Испытание на параллельность также несколько видоизменяется. Значение c^2 для непараллельности делят на соответствующее число степеней свободы. Полученное значение делится на рассчитанное выше значение s^2, для определения *F*-отношения с *h-1* и *N-2h* степенями свободы, которое оценивают обычным способом при уровне значимости 0,05.

4.3. МЕТОД ЛОГИТ-АНАЛИЗА

Как отмечалось в Разделе 4.1 в некоторых случаях метод логит-анализа является наиболее приемлемым. Название метода происходит от названия функции логит-преобразования, которая является обратной функции логистического распределения. Процедура в этом случае аналогична той, которая описана для метода пробит-анализа, за исключением того, что видоизменяются две формулы для расчета значений *Φ* и *Z*.

$$\Phi = \frac{1}{1+e^{-Y}} \qquad (4.3.\text{-}1)$$

$$Z = \frac{e^{-Y}}{(1+e^{-Y})^2} \qquad (4.3.\text{-}2)$$

4.4. ДРУГИЕ ФОРМЫ КРИВОЙ

Для анализа количественных результатов тестов, предусмотренных Фармакопеей, почти всегда приемлемыми являются методы пробит- и логит-анализа. Однако, если форма кривой зависимости «*ln(*доза)–эффект» отличается от форм этих двух кривых, следует взять другую зависимость – *Φ*. *Z* в этом случае берется как первая производная от *Φ*.

Например, если выявляется, что кривая несимметрична, приемлемым может быть распределение Гомпертца (Gompertz) (метод гомпит-анализа). В этом случае

$$\Phi = 1 - e^{-eY}, \text{ а } Z = e^{Y - e^{Y}}.$$

4.5. МЕДИАННАЯ ЭФФЕКТИВНАЯ ДОЗА

Для некоторых типов количественных определений необходимо определить медианную эффективную дозу, т.е. дозу, позитивный эффект на которую дают 50% объектов ($ЕД_{50}$). Для определения этой дозы можно применить метод пробит-анализа, но поскольку при этом нет необходимости сравнивать эту дозу со стандартным препаратом, формулы несколько отличаются.

Примечание: стандартный препарат может эпизодически применяться при использовании данного метода с целью проверки достоверности количественного определения. Обычно результаты количественного определения считаются достоверными, если рассчитанное значение $ЕД_{50}$ для стандартного препарата достаточно близко к

принятому значению $ЕД_{50}$. Значение термина «достаточно близко» в данном контексте зависит от требований, предъявляемых в конкретной монографии на лекарственный препарат.

Подготовка рабочих таблиц результатов, полученных для испытуемых препаратов, и, при необходимости, для стандартного, описана в Разделе 4.2.1. Проверка линейности описана в Разделе 4.2.2. Проверка параллельности для данного типа количественного определения не требуется. Значение $ЕД_{50}$ для испытуемого препарата *T* (и аналогично для других тестируемых образцов) рассчитывается, как описано в Разделе 4.2.3, при этом изменяются формулы 4.2.3.-1 и 4.2.3.-2.

$$M_T' = \frac{-a_T}{b} \qquad (4.5.\text{-}1)$$

$$CM_T' - (C-1)\bar{x}_T \pm \sqrt{(C-1)(V\sum S_{xx} + C(M_T' + \bar{x}_T)^2)} \qquad (4.5.\text{-}2)$$

где :

$$V = \frac{1}{\sum_T \omega},$$

а значение *C* остается без изменений.

5. ПРИМЕРЫ

В данном разделе приведены примеры, иллюстрирующие применение вышеописанных формул. Примеры подбирались, главным образом, с целью проиллюстрировать статистические методы обработки результатов. Их выбор в каждом случае не означает преимущество того или иного метода количественного определения перед альтернативными методами, которые допускаются конкретной частной статьей. Для того, чтобы сделать примеры подходящими для проверки достоверности работы компьютерных программ, в них приводится большее количество десятичных знаков, чем это обычно необходимо на практике. Следует также отметить, что существуют и альтернативные эквивалентные методики расчетов. Результаты, полученные при использовании этих методик, должны быть точно такими же, как и те, которые приводятся в данных примерах.

5.1. МОДЕЛЬ ПАРАЛЛЕЛЬНЫХ ЛИНИЙ.

5.1.1 ДВУХДОЗОВОЕ МНОГОКРАТНОЕ КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СХЕМЫ ПОЛНОЙ РАНДОМИЗАЦИИ.

Количественное определение активности кортикотропина путем подкожной инъекции у крыс.

Стандартный препарат вводили в дозах от 0,25 до 1,0 ЕД на 100 г массы тела. Предполагалось, что оба испытуемых препарата имели активность 1 ЕД/мг и вводились в тех же количествах, что и стандартный. Значения эффектов и средние значения приведены в Таблице 5.1.1.-1.

Таблица 5.1.1.-1.

Измеряемый эффект y – масса аскорбиновой кислоты (мг) на 100 г надпочечника.

	Стандартный препарат *S*		Испытуемый препарат *T*		Испытуемый препарат *U*	
	S_1	S_2	T_1	T_2	U_1	U_2
	300	289	310	230	250	236
	310	221	290	210	268	213
	330	267	360	280	273	283
	290	236	341	261	240	269
	364	250	321	241	307	251
	328	231	370	290	270	294
	390	229	303	223	317	223
	360	269	334	254	312	250
	342	233	295	216	320	216
	306	259	315	235	265	265
Среднее	332,0	248,4	323,9	244,0	282,2	250,0

Графическое представление результатов не дает поводов сомневаться в однородности дисперсий и нормальности распределения данных, но возникают некоторые сомнения, относительно параллельности результатов для препарата *U*.

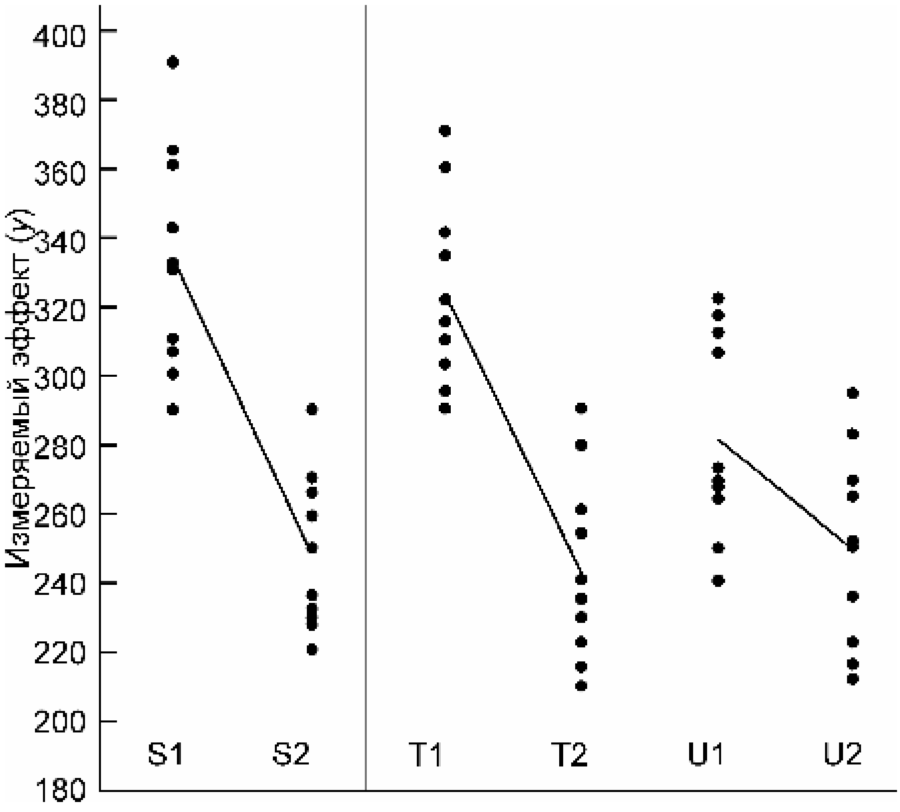


Рисунок 5.1.1.-1.

Расчет по формулам, приведенным в Таблицах 3.2.3.-1 и 3.2.3.-2, дал следующие результаты:

P_S = 580,4 L_S = -41,8
P_T = 567,9 L_T = -39,95
P_U = 532,2 L_U = -16,1

$H_P = \frac{10}{2} = 5$ $H_L = \frac{120}{6} = 20$

Далее проводят дисперсионный анализ по формулам, приведенным в Таблицах 3.2.3.-3 и 3.2.3.-4. Результаты приведены в Таблице 5.1.1.-2.

Таблица 5.1.1.-2.

Дисперсионный анализ

Источник вариации	Степени свободы	Сумма квадратов отклонений	Дисперсия (средний квадрат отклонения)	F-отношение	Вероятность
Препараты	2	6256,6	3128,3		
Линейная регрессия	1	63 830,8	63 830,8	83,38	0,000
Непараллельность	2	8218,2	4109,1	5,37	0,007
Группы	5	78 305,7			
Неисключенная погрешность	54	41 340,9	765,57		
Общая вариация	59	119 646,6			

Анализ подтвердил высокую значимость линейной регрессии. Отклонение от параллельности для препарата U по сравнению со стандартным препаратом, которое ожидалось на основании анализа графического представления результатов, тем не менее также оказалось значимым (p = 0,0075). По этой причине препарат U исключают и анализ повторяют только для препарата T и стандартного препарата.

Таблица 5.1.1.-3.

Дисперсионный анализ без препарата U.

Источник вариации	Степени свободы	Сумма квадратов отклонений	Дисперсия (средний квадрат отклонений)	F-отношение	Вероятность
Препараты	1	390,6	390,6		
Регрессия линейная	1	66 830,6	66 830,6	90,5	0,000
Непараллельность	1	34,2	34,2	0,05	0,831
Группы	3	67 255,5			
Неисключенная погрешность	36	26 587,3	738,54		
Общая вариация	39	93 842,8			

Анализ, проведенный без препарата U, свидетельствует о соответствии условиям как линейности регрессии, так и параллельности, что позволяет перейти к расчету активности. Используя формулы, приведенные в Разделе 3.2.5, получаем следующие результаты:

Общий угловой коэффициент:

$$b = \frac{20(-41,8 - 39,95)}{ln4 \times 10 \times 2} = -58,970$$

Натуральный логарифм отношения активностей:

$$M'_T = \frac{567{,}9 - 580{,}4}{2 \times (-58{,}970)} = 0{,}1060$$

$$C = \frac{66830{,}6}{66830{,}6 - 738{,}54 \times 2{,}028^2} = 1{,}0476$$

$$V = \frac{66830{,}6}{(-58{,}970)^2 \times 2 \times 10} = 0{,}9609$$

Натуральный логарифм доверительных интервалов:

$$1{,}0476 \times 0{,}1060 \pm \sqrt{0{,}0476 \times (1{,}0476 \times 0{,}1060^2 + 2 \times 0{,}9609)} = 0{,}1110 \pm 0{,}3034$$

Вычислив антилогарифм, мы найдем отношение активностей, равное 1,11, при 95% доверительном интервале от 0,82 до 1,51.

Умножение на предполагаемую активность препарата *T*, дает рассчитанную активность 1,11 ЕД/мг при 95% доверительном интервале от 0,82 до 1,51 ЕД/мг.

5.1.2 ТРЕХДОЗОВОЕ КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СХЕМЫ ЛАТИНСКИХ КВАДРАТОВ.

Количественное определение антибиотика методом диффузии в агар, используя прямоугольный планшет.

Стандартный препарат имел установленную активность, равную 4855 МЕ/мг. Предполагаемая активность испытуемого препарата принималась равной 5600 МЕ/мг. Исходные растворы готовились следующим образом: 25,2 мг стандартного препарата растворяли в 24,5 мл растворителя и 21,4 мг испытуемого препарата растворяли в 23,95 мл растворителя. Для анализа исходные растворы сначала разводили в соотношении 1/20, а затем, используя степень разведения 1,5.

Латинские квадраты строились при помощи метода, описанного в Разделе 8.6 (см. Таблицу 5.1.2.-I). Результаты, полученные в ходе данного количественного определения, приведены в Таблице 5.1.2.-II (зоны ингибирования роста в мм ×10). Средние значения для групп приведены в Таблице 5.1.2.-III. Графическое представление данных (см. Рисунок 5.1.2.-I) не дает поводов сомневаться в нормальности распределения и однородности дисперсий.

Используя формулы, приведенные в Таблицах 3.2.3.-I и 3.2.3.-II, получаем следующие результаты:

$P_S = 529{,}667$ $\qquad L_S = 35{,}833$

$P_T = 526{,}333$ $\qquad L_T = 39{,}333$

$H_P = \frac{6}{3} = 2$ $\qquad H_L = \frac{72}{24} = 3$

Далее проводят дисперсионный анализ по формулам, приведенным в Таблицах 3.2.3.-3 и 3.2.3.-4. Результаты приведены в Таблице 5.1.2.-4.

Анализ показывает значительные различия между строками. Это означает, что использование схемы Латинских квадратов обеспечивает в данном случае более высокую точность по сравнению со схемой полной рандомизации. Высокая значимость регрессии, а также отсутствие значимого отклонения индивидуальных линий регрессии от параллельности и линейности, подтверждают, что результаты количественного определения пригодны для расчета активности.

Таблица 5.1.2.-1.

Расположение препаратов в планшете

	1	2	3	4	5	6
1	S_1	T_1	T_2	S_3	S_2	T_3
2	T_1	T_3	S_1	S_2	T_2	S_3
3	T_2	S_3	S_2	S_1	T_3	T_1
4	S_3	S_2	T_3	T_1	S_1	T_2
5	S_2	T_2	S_3	T_3	T_1	S_1
6	T_3	S_1	T_1	T_2	S_3	S_2

Таблица 5.1.2.-2.

Измеренные зоны ингибирования роста в мм ´10

	1	2	3	4	5	6	Среднее по строкам
1	161	160	178	187	171	194	175,2 = R_1
2	151	192	150	172	170	192	171,2 = R_2
3	162	195	174	161	193	151	172,7 = R_3
4	194	184	199	160	163	171	178,5 = R_4
5	176	181	201	202	154	151	177,5 = R_5
6	193	166	161	186	198	182	181,0 = R_6
Среднее	172,8 = C_1	179,7 = C_2	177,2 = C_3	178,0 = C_4	174,8 = C_5	173,5 = C_6	

Таблица 5.1.2.-3.

Средние значения

	Стандартный препарат S			Испытуемый препарат T		
	S_1	S_2	S_3	T_1	T_2	T_3
Среднее	158,67	176,50	194,50	156,17	174,67	195,50

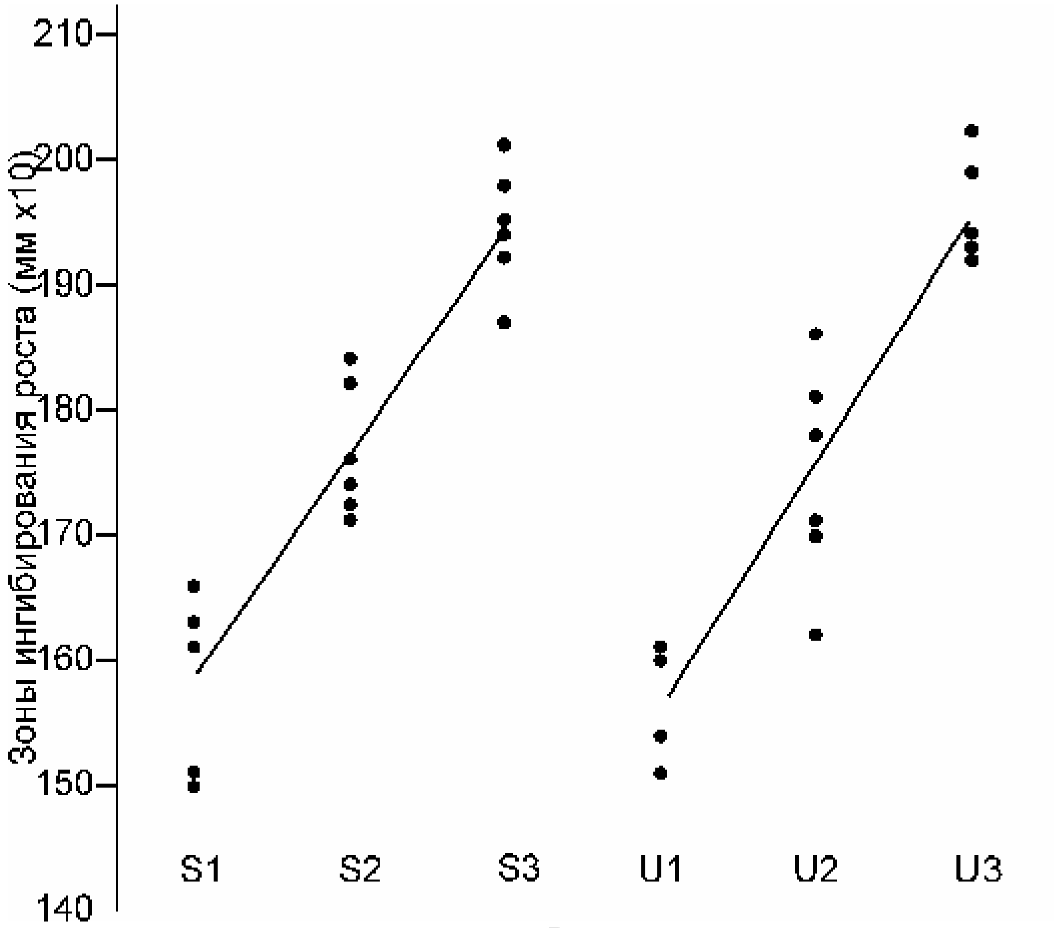


Рисунок 5.1.2.-1.

Таблица 5.1.2.-4.

Дисперсионный анализ

Источник вариации	Степени свободы	Сумма квадратов отклонений	Дисперсия (средний квадрат отклонения)	F-отношение	Вероятность
Препараты	1	11,1111	11,1111		
Регрессия линейная	1	8475,0417	8475,0417	408,1	0,000
Непараллельность	1	18,3750	18,3750	0,885	0,358
Нелинейность	2	5,4722	2,7361	0,132	0,877
Группы	5	8510			
Строки	5	412	82,40	3,968	0,012
Столбцы	5	218,6667	43,73	2,106	0,107
Неисключенная погрешность	20	415,3333	20,7667		
Общая вариация	35	9556			

Используя формулы, приведенные в Разделе 3.2.5, получаем следующие результаты:

Общий угловой коэффициент:

$$b = \frac{3 \times (35{,}833 + 39{,}333)}{ln(1{,}5) \times 6 \times 2} = 46{,}346$$

Натуральный логарифм отношения активностей:

$$M_T' = \frac{526{,}333 - 529{,}667}{3 \times 46{,}346} = -0{,}023974$$

$$C = \frac{8475{,}0417}{8475{,}0417 - 20{,}7667 \times 2{,}086^2} = 1{,}0108$$

$$V = \frac{8475{,}0417}{46{,}346^2 \times 3 \times 6} = 0{,}2192$$

Натуральный логарифм доверительных интервалов:

$$1{,}0108 \times (-0{,}0240) \pm \sqrt{0{,}0108 \times (-0{,}0240)^2 + 2 \times 0{,}2192} = -0{,}02423 \pm 0{,}06878$$

Вычислив антилогарифм, мы найдем отношение активностей, равное 0,9763 при 95% доверительном интервале от 0,9112 до 1,0456.

Поскольку разведения, приготовленные исходя из предполагаемой активности, не были точно равноактивными, следует ввести поправочный коэффициент

$$\frac{4855 \times 25{,}2 / 24{,}5}{5600 \times 21{,}4 / 23{,}95} = 0{,}99799$$

Перемножая данный коэффициент и предполагаемую активность препарата 5600 МЕ/мг, получаем рассчитанную активность 5456 МЕ/мг при 95% доверительном интервале от 5092 до 5843 МЕ/мг.

5.1.3 ЧЕТЫРЕХДОЗОВАЯ СХЕМА РАНДОМИЗИРОВАННЫХ БЛОКОВ

Количественное определение антибиотика турбидиметрическим методом

Данное количественное определение проводят с целью установления активности антибиотика в международных единицах на флакон. Стандартный препарат имел установленную активность 670 МЕ/мг. Предполагаемая активность испытуемого препарата принималась равной 20 000 ЕД/флакон. Исходя из этих данных исходные растворы готовились следующим образом: 16,7 мг стандартного препарата растворяли в 25 мл растворителя, а содержимое одного флакона испытуемого препарата растворяли в 40 мл растворителя. Для анализа исходные растворы сначала разводили в соотношении 1/40, а затем, используя степень разведения 1,5. Пробирки размещали в водяной бане в соответствии со схемой рандомизированного блока (см. Раздел 8.5). Полученные результаты приведены в Таблице 5.1.3.-1.

Анализ Рисунка 5.1.3.-1 не дает оснований сомневаться в справедливости предположения о нормальности распределения данных и однородности дисперсий. Стандартное отклонение S_3 несколько велико, но не является причиной для беспокойства. Используя формулы, приведенные в Таблицах 3.2.3.-1 и 3.2.3.-2, получаем следующие результаты:

$P_S = 719{,}4$ $\quad$ $L_S = -229{,}1$

$P_T = 687{,}6$ $\quad$ $L_T = -222$

$H_P = \frac{5}{4} = 1{,}25$ $\quad$ $H_L = \frac{60}{60} = 1$

Далее проводим дисперсионный анализ по формулам, приведенным в Таблицах 3.2.3.-3 и 3.2.3.-4. Полученные результаты приведены в Таблице 5.1.3.-2.

Таблица 5.1.3.-1.

Показатель оптического поглощения суспензий (´1000)

	Стандартный препарат S				Испытуемый препарат T				
Блок	S_1	S_2	S_3	S_4	T_1	T_2	T_3	T_4	Среднее
1	252	207	168	113	242	206	146	115	181,1
2	249	201	187	107	236	197	153	102	179,0
3	247	193	162	111	246	197	148	104	176,0
4	250	207	155	108	231	191	159	106	175,9
5	235	207	140	98	232	186	146	95	167,4
Среднее	246,6	203,0	162,4	107,4	237,4	195,4	150,4	104,4	

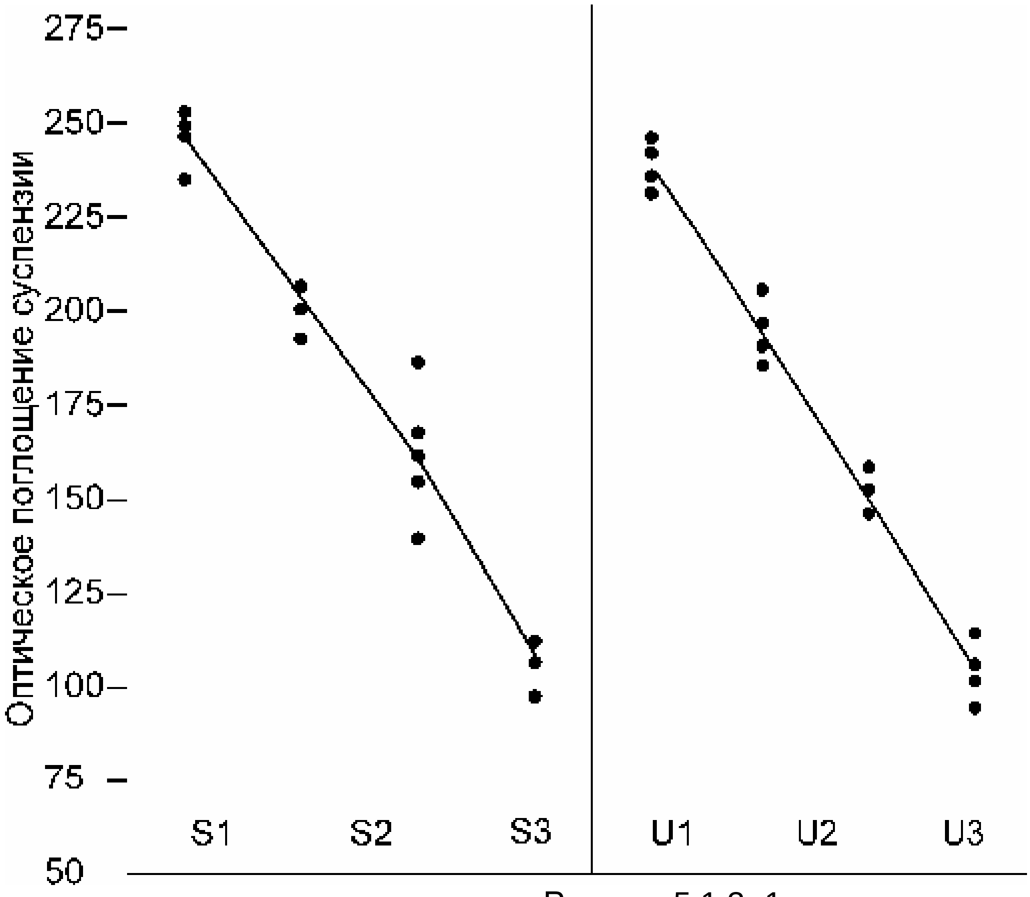


Рисунок 5.1.3.-1.

Таблица 5.1.3.-2.

Дисперсионный анализ

Источник вариации	Степени свободы	Сумма квадратов отклонений	Дисперсия (средний квадрат отклонения)	F-отношение	Вероятность
Препараты	1	632,025	632,025		
Регрессия линейная	1	101 745,6	101 745,6	1887,1	0,000
Непараллельность	1	25,205	25,205	0,467	0,500
Нелинейность	4	259,14	64,785	1,202	0,332
Группы	7	102 662			
Блоки	4	876,75	219,188	4,065	0,010
Неисключенная погрешность	28	1509,65	53,916		
Общая вариация	39	105 048,4			

Следует отметить значительное различие между блоками. Это означает, что применение схемы рандомизированных блоков позволяет добиться более высокой точности оценки. Высокая значимость регрессии, а также отсутствие значимого отклонения от параллельности и линейности подтверждают, что результаты количественного определения пригодны для расчета активности.

Используя формулы, приведенные в Разделе 3.2.5, получаем следующие результаты:

Общий угловой коэффициент:

$$b = \frac{1 \times (-229{,}1 - 222)}{\ln(1{,}5) \times 5 \times 2} = -111{,}255$$

Натуральный логарифм отношения активностей:

$$M_T' = \frac{687{,}6 - 719{,}4}{4 \times (-111{,}255)} = 0{,}071457$$

$$C = \frac{101745{,}6}{101745{,}6 - 53{,}916 \times 2{,}048^2} = 1{,}00223$$

$$V = \frac{101745{,}6}{(-111{,}255)^2 \times 4 \times 5} = 0{,}4110$$

Натуральный логарифм доверительных интервалов:

$$1{,}00223 \times 0{,}0715 \pm \sqrt{0{,}00223 \times 0{,}0715^2 + 2 \times 0{,}4110} = 0{,}07162 \pm 0{,}04293$$

Вычислив антилогарифм, мы найдем отношение активностей, равное 1,0741 при 95% доверительном интервале от 1,0291 до 1,1214.

Поскольку разведения, приготовленные исходя из предполагаемой активности, не были точно равноактивными, следует ввести поправочный коэффициент

$$\frac{670 \times 16{,}7 / 25}{20000 \times 1/40} = 0{,}89512$$

Перемножая данный коэффициент и предполагаемую активность препарата 20000 МЕ/флакон, получаем рассчитанную активность 19228 МЕ/флакон при 95% доверительном интервале от 18423 до 20075 МЕ/флакон.

5.1.4 ПЯТИДОЗОВОЕ МНОГОКРАТНОЕ КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СХЕМЫ ПОЛНОЙ РАНДОМИЗАЦИИ

Количественное определение in vitro активности трех вакцин против Гепатита В по сравнению со стандартным препаратом

Для каждой из вакцин подготавливали по три независимые серии разведений, каждая из которых состоит из пяти двукратных разведений. После определенных подготовительных операций, предусмотренных процедурой количественного определения, измеряли оптические плотности растворов. Результаты приведены в Таблице 5.1.4.-1.

Таблица 5.1.4.-1.

Оптические плотности растворов вакцин

Разведение	Стандартный препарат S			Испытуемый препарат T		
1:16 000	0,043	0,045	0,051	0,097	0,097	0,094
1:8000	0,093	0,099	0,082	0,167	0,157	0,178
1:4000	0,159	0,154	0,166	0,327	0,355	0,345
1:2000	0,283	0,295	0,362	0,501	0,665	0,576
1:1000	0,514	0,531	0,545	1,140	1,386	1,051

Разведение	Испытуемый препарат U			Испытуемый препарат V		
1:16 000	0,086	0,071	0,073	0,082	0,082	0,086
1:8000	0,127	0,146	0,133	0,145	0,144	0,173
1:4000	0,277	0,268	0,269	0,318	0,306	0,316
1:2000	0,586	0,489	0,546	0,552	0,551	0,624
1:1000	0,957	0,866	1,045	1,037	1,039	1,068

Как известно, натуральные логарифмы оптических плотностей раствора имеют линейную зависимость от логарифмов доз растворенного вещества. Средние результаты логарифмического преобразования оптических плотностей приведены в Таблице 5.1.4.-2. Графическое представление результатов не выявило каких-либо необычных закономерностей расположения данных.

Таблица 5.1.4.-2.

Средние значения натуральных логарифмов оптических плотностей растворов вакцины

S_1 − 3,075	T_1 − 2,344	U_1 − 2,572	V_1 − 2,485
S_2 − 2,396	T_2 − 1,789	U_2 − 2,002	V_2 − 1,874
S_3 − 1,835	T_3 − 1,073	U_3 − 1,305	V_3 − 1,161
S_4 − 1,166	T_4 − 0,550	U_4 − 0,618	V_4 − 0,554
S_5 − 0,635	T_5 0,169	U_5 − 0,048	V_5 0,047

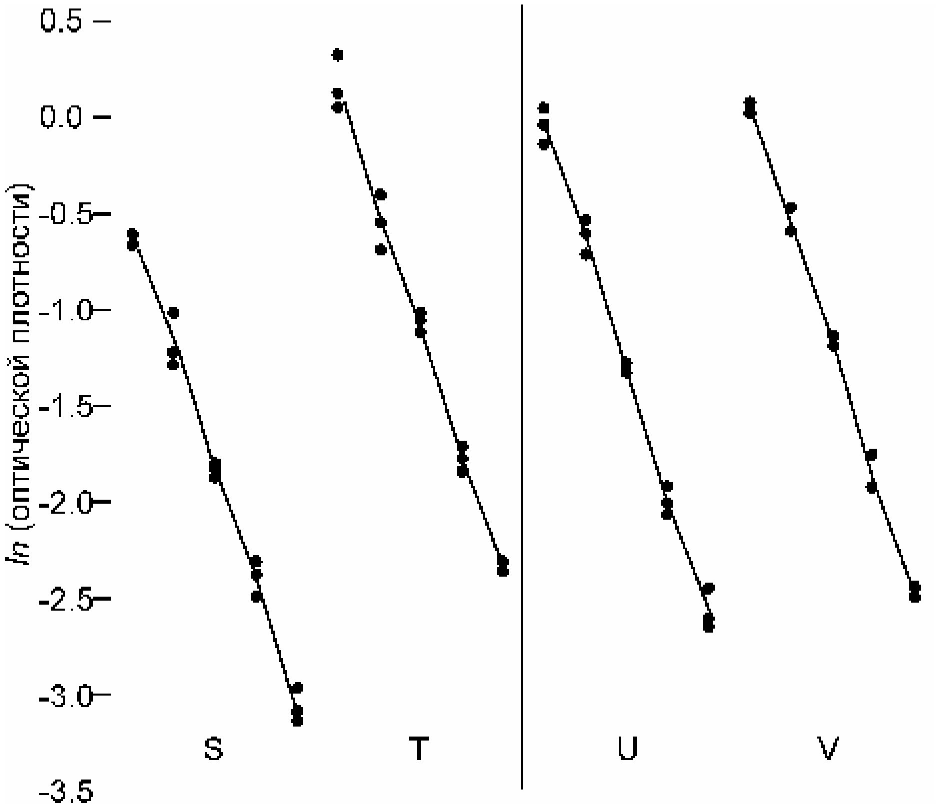


Рисунок 5.1.4.-1.

Используя формулы, приведенные в Таблицах 3.2.3.-1 и 3.2.3.-2, получаем следующие результаты:

P_S = -9,108 L_S = 6,109
P_T = -5,586 L_T = 6,264
P_U = -6,544 L_U = 6,431
P_V = -6,027 L_V = 6,384

$H_P = \frac{3}{5} = 0{,}6$ $H_L = \frac{36}{120} = 0{,}3$

Далее проводим дисперсионный анализ по формулам, приведенным в Таблицах 3.2.3.-3 и 3.2.3.-4. Полученные результаты приведены в Таблице 5.1.4.-3.

Таблица 5.1.4.-3.

Дисперсионный анализ

Источник вариации	Степени свободы	Сумма квадратов отклонений	Дисперсия (средний квадрат отклонений)	F-отношение	Вероятность
Препараты	3	4,475	1,492		
Регрессия линейная	1	47,58	47,58	7126	0,000
Непараллельность	3	0,0187	0,006	0,933	0,434
Нелинейность	12	0,0742	0,006	0,926	0,531
Группы	19	52,152			
Неисключенная погрешность	40	0,267	0,0067		
Общая вариация	59	52,42			

Высокая значимость регрессии, а также отсутствие значимого отклонения от параллельности и линейности подтверждают, что результаты данного количественного определения пригодны для расчета активности.

Используя формулы, приведенные в Разделе 3.2.5, получаем следующие результаты:

Общий угловой коэффициент:

$$b = \frac{0,3 \times (6,109 + 6,264 + 6,431 + 6,384)}{\ln 2 \times 3 \times 4} = 0,90848$$

Натуральный логарифм отношения активностей:

$$M_T' = \frac{-5,586 - (-9,108)}{5 \times 0,90848} = 0,7752$$

$$C = \frac{47,58}{47,58 - 0,0067 \times 2,021^2} = 1,00057$$

$$V = \frac{47,58}{0,9085^2 \times 5 \times 3} = 3,8436$$

Натуральный логарифм доверительных интервалов:

$$1,00057 \times 0,7752 \pm \sqrt{0,00057 \times (1,00057 \times 0,7752^2 + 2 \times 3,8436)} = 0,756 \pm 0,0689$$

Вычислив антилогарифм, мы найдем отношение активностей вакцин, равное 2,171 при 95% доверительном интервале от 2,027 до 2,327.
Все образцы имеют установленную активность 20 мкг протеина/мл и, следовательно, найденная активность испытуемого препарата T равна 43,4 мкг протеина/мл при 95% доверительном интервале от 40,5 до 46,5 мкг протеина/мл.
Аналогичным образом вычисляют активность и доверительные интервалы для других испытуемых препаратов. Полученные результаты приведены в Таблице 5.1.4.-4.

Таблица 5.1.4.-4.

Окончательные результаты оценки активностей испытуемых вакцин (мкг протеина/мл) и 95% доверительные интервалы

	Нижняя граница	Оценка	Верхняя граница
Вакцина T	40,5	43,4	46,5
Вакцина U	32,9	35,2	37,6
Вакцина V	36,8	39,4	42,2

5.1.5 ДВОЙНАЯ ПЕРЕКРЕСТНАЯ СХЕМА

Количественное определение активности инсулина путем подкожной инъекции у кроликов

Стандартный препарат вводился в дозах 1 и 2 ЕД/мл. Эквивалентные дозы испытуемого препарата назначались исходя из предполагаемой активности 40 ЕД/мл. Кроликам подкожно вводили 0,5 мл соответствующих растворов в соответствии со схемой, приведенной в Таблице 5.1.5.-1. полученные результаты приведены в таблице 5.1.5.-2. Высокое значение дисперсии свидетельствует о наличии статистически значимых различий между кроликами и необходимости использовать перекрестную схему исследования.

Таблица 5.1.5.-1.

Планирование исследования

	Группа кроликов			
	1	2	3	4
День 1	S_1	S_2	T_1	T_2
День 2	T_2	T_1	S_2	S_1

Таблица 5.1.5.-2.

Эффект y: сумма результатов содержания глюкозы в крови (мг/100 мл) через 1 час и 2,5 часа

	Группа 1		Группа 2		Группа 3		Группа 4	
	S_1	T_2	S_2	T_1	T_1	S_2	T_2	S_1
	112	104	65	72	105	91	118	144
	126	112	116	160	83	67	119	149
	62	58	73	72	125	67	42	51
	86	63	47	93	56	45	64	107
	52	53	88	113	92	84	93	117
	110	113	63	71	101	56	73	128
	116	91	50	65	66	55	39	87
	101	68	55	100	91	68	31	71
Среднее	95,6	82,8	69,6	93,3	89,9	66,6	72,4	106,8

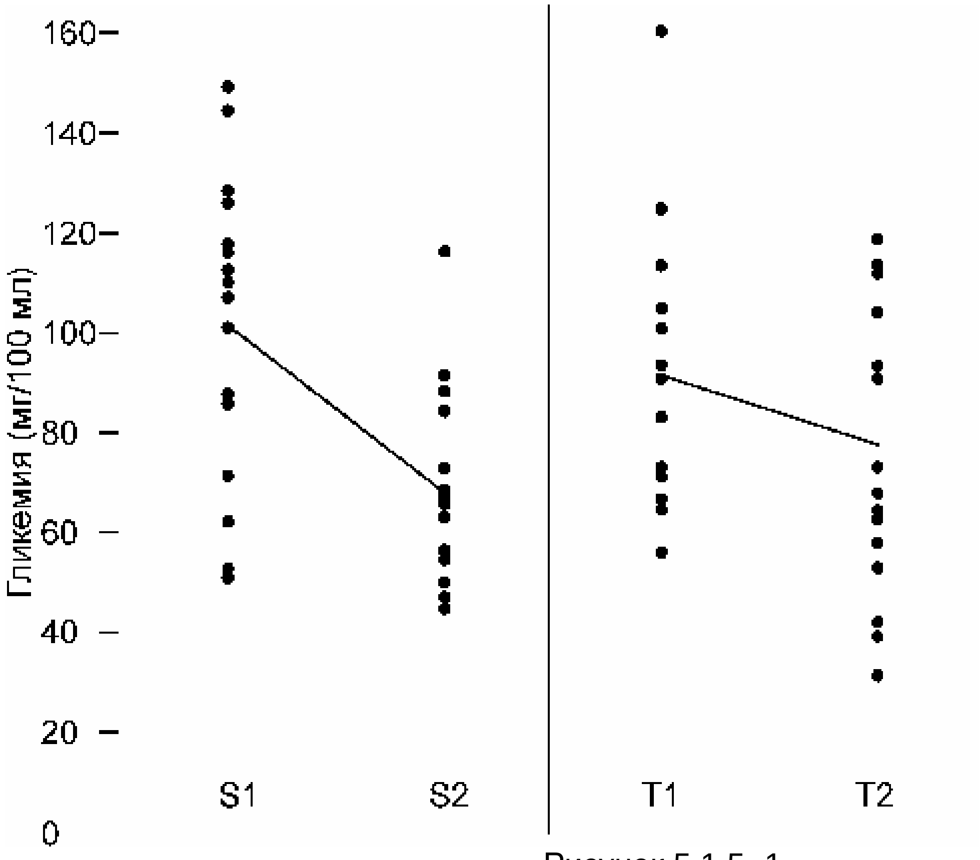


Рисунок 5.1.5.-1.

Для рассматриваемой схемы количественного определения применение дисперсионного анализа является более сложным, чем рассмотренных ранее схем, потому что компонента вариации, обусловленная параллельностью, не является независимой от компонента, обусловленного различием между кроликами. Поэтому проверка па-

раллельности линий регрессий дополнительно требует второй поправочный коэффициент для ошибки среднего квадрата отклонений (дисперсии), который вычисляется путем вычитания компонента параллельности и пар «взаимодействующих» компонентов из компонента, связанного с различием между кроликами.
За счет повторений в каждой из групп, в дисперсионном анализе присутствуют три пары «взаимодействующих» компонентов:

Дни × препарат; дни × регрессия; дни × параллельность.

Эти коэффициенты характеризуют тенденцию компонентов (препараты, регрессия и параллельность) изменяться в серии «изо дня в день». Таким образом, соответствующие *F*-отношения обеспечивают проверку этих компонентов оценки достоверности количественного определения. Если статистическая значимость полученных оценок *F*-отношений является высокой, следует с большой осторожностью интерпретировать результаты количественного определения и, если это возможно, следует повторить количественное определение активности инсулина.

Дисперсионный анализ проводится с использованием формул, приведенных в Таблицах 3.2.3.-1. – 3.2.3.-3., отдельно как для каждого дня, так и для объединенного набора данных. Используя формулы, приведенные в Таблицах 3.2.3.-1. и 3.2.3.-2, получаем следующие результаты:

День 1:

$P_S = 165,25$ $L_S = -13$

$P_T = 162,25$ $L_T = -8,75$

$$H_P = \frac{8}{2} = 4 \qquad H_L = \frac{96}{6} = 16$$

День 2:

$P_S = 173,38$ $L_S = -20,06$

$P_T = 176,00$ $L_T = -5,25$

$$H_P = \frac{8}{2} = 4 \qquad H_L = \frac{96}{6} = 16$$

Объединенные данные:

$P_S = 196,31$ $L_S = -16,53$

$P_T = 169,13$ $L_T = -7,00$

$$H_P = \frac{16}{2} = 8 \qquad H_L = \frac{192}{6} = 32$$

Используя формулы, приведенные в Таблице 3.2.3.-3, получаем следующие результаты:

День 1	День 2	Объединенные данные
SS_{prep} = 18,000	SS_{prep} = 13,781	SS_{prep} = 0,141
SS_{reg} = 3784,5	SS_{reg} = 5125,8	SS_{reg} = 8859,5
SS_{par} = 144,5	SS_{par} = 1755,3	SS_{par} = 1453,5

Коэффициенты взаимодействия рассчитывают как: «*День1+День2-Объединенные данные*».

$SS_{days\times prep} = 31,64$

$SS_{days\times reg} = 50,77$

$SS_{days\times par} = 446,27$

Дополнительно, рассчитывают сумму квадратов отклонений вследствие вариации в серии «изо-дня-в-день»:

$$SS_{days} = \frac{1}{2}N(D_1^2 + D_2^2) - K = 478,52$$

и сумму квадратов отклонений вследствие вариаций в блоках (различие между кроликами):

$$SS_{block} = 2\sum B_i^2 - K = 39794,7$$

где B_i – среднее значение в пересчете на одного кролика.

Далее проводят дисперсионный анализ, результаты которого приведены в Таблице 5.1.5.-3.

Таблица 5.1.5.-3.

Дисперсионный анализ

Источник вариации	Степени свободы	Сумма квадратов	Средний квадрат	F-отношение	Вероятность
Непараллельность	1	1453,5	1453,5	1,064	0,311
Дни × Препарат	1	31,6	31,6	0,023	0,880
Дни × Регрессия	1	50,8	50,8	0,037	0,849
Неисключенная погрешность между группами кроликов	28	38 258,8	1366,4		
Кролики	31	39 794,7	1283,7		
Препараты	1	0,14	0,14	0,001	0,975
Регрессия	1	8859,5	8859,5	64,532	0,000
Дни	1	478,5	478,5	3,485	0,072
Дни × непараллельность.	1	446,3	446,3	3,251	0,082
Неисключенная погрешность в пределах группы кроликов	28	3844,1	137,3		
Итого	63	53 423,2			

Дисперсионный анализ подтверждает, что полученные данные удовлетворяют необходимым условиям обоснованности оценки активности инсулина: высокая статистическая значимость линейной регрессии, отсутствие статистически значимых отклонений от параллельности и незначимые все три коэффициента взаимодействия.

Используя формулы, приведенные в Разделе 3.2.5, получаем следующие результаты:

Общий угловой коэффициент:

$$b = \frac{32 \times (-16,53 - 7)}{ln2 \times 16 \times 2} = -33,95$$

Натуральный логарифм отношения активностей:

$$M_T' = \frac{169,13 - 169,31}{2 \times (-33,95)} = 0,00276$$

$$C = \frac{8859,5}{8859,5 - 137,3 \times 2,048^2} = 1,0695$$

$$V = \frac{8859,5}{(-33,95)^2 \times 2 \times 16} = 0,2402$$

Натуральный логарифм доверительного интервала:

$$1,0695 \times 0,00276 \pm \sqrt{0,0695 \times (1,0695 \times 0,00276^2 + 2 \times 0,2402)} = 0,00295 \pm 0,18279$$

Вычислив антилогарифм, мы найдем отношение активностей, равное 1,003 при 95% доверительном интервале от 0,835 до 1,204.

Умножив на A_T = 40, получим активность 40,1 единиц на миллилитр при 95% доверительном интервале от 33,4 до 48,2 единиц на миллилитр.

5.2. МОДЕЛЬ УГЛОВЫХ КОЭФФИЦИЕНТОВ

5.2.1 (0,3,3) СХЕМА ПОЛНОЙ РАНДОМИЗАЦИИ

Количественное определение активности фактора VIII

Предположим, в лаборатории выполняют количественное определение активности фактора VIII в концентратах по образованию окрашенного продукта. Предположим также, что лаборатория не имеет опыта в проведении количественного определения подобного рода, но тем не менее попыталась выполнить эту процедуру. Готовят по три эквивалентных разведения для стандартного и испытуемого препаратов. Дополнительно готовят препарат «плацебо», хотя и не ожидается наличия линейной зависимости эффекта от дозы в области малых доз. Число повторений для каждого из разведений равно восьми, что несколько больше, чем требуется при выполнении ежедневных количественных определений.

Графическое представление данных показывает, что зависимость результата от дозы действительно не линейна в области малых доз. На этом основании результаты, полученные при анализе препарата «плацебо», не будут использоваться при расчетах (в дальнейшем для подтверждения данного решения, безусловно нужно будет провести повторные определения с препаратом «плацебо»). Используя формулы, приведенные в Таблицах 3.3.3.1-1 и 3.3.3.1.-2, получаем следующие результаты:

$P_S = 0{,}6524$	$P_T = 0{,}5651$
$L_S = 1{,}4693$	$L_T = 1{,}2656$
$a_S = 0{,}318$	$a_t = 0{,}318$
$b_S = 0{,}329$	$b_T = 0{,}271$
$G_S = 0{,}1554$	$G_T = 0{,}1156$
$J_S = 4{,}17\times10^{-8}$	$J_T = 2{,}84\times10^{-6}$

и

$H_I = 0{,}09524$ $a' = 0{,}05298$ $K = 1{,}9764$

Далее выполняют дисперсионный анализ по формулам, приведенным в Таблицах 3.3.3.1.-3 и 3.3.3.1.-4.

Высокая значимость регрессии и отсутствие значимых отклонений от линейности и точки пересечения оси ординат, дают основание для расчета активности.

Угловой коэффициент стандартного препарата

$$b_S' = \frac{6\times1{,}469 - 36\times0{,}0530}{84} = 0{,}0822$$

Угловой коэффициент испытуемого препарата

$$b_T' = \frac{6\times1.266 - 36\times0{,}0530}{84} = 0{,}0677$$

По формуле 3.3.5.1.-3 получаем

$$R = \frac{0{,}0677}{0{,}0822} = 0{,}823$$

$$C = \frac{0{,}0822^2}{0{,}0822^2 - 3{,}86 \cdot 10^{-6} \times 2{,}018^2 \times 0{,}0357} = 1{,}000083$$

$$K' = 0{,}000083 \times 0{,}75 = 0{,}000062$$

а 95% доверительный интервал равен

$$0823 \pm \sqrt{0{,}000083 \times 1{,}678 + 0{,}000062 \times (-1{,}646)} = 0{,}823 \pm 0{,}006$$

Таким образом, полученная активность равна 0,823 с 95% доверительным интервалом от 0,817 до 0,0826.

Таблица 5.2.1.-1.

Показатели оптической плотности

	Плацебо	Стандартный препарат S (в МЕ/мл)			Испытуемый препарат T (в МЕ/мл)		
Концентрация	B	S_1 0,01	S_2 0,02	S_3 0,03	T_1 0,01	T_2 0,02	T_3 0,03
	0,022	0,133	0,215	0,299	0,120	0,188	0,254
	0,024	0,133	0,215	0,299	0.119	0,188	0,253
	0,024	0,131	0,216	0,299	0,118	0,190	0,255
	0,026	0,136	0,218	0,297	0,120	0,190	0,258
	0,023	0,137	0,220	0,297	0,120	0,190	0,257
	0,022	0,136	0,220	0,305	0,121	0,191	0,257
	0,022	0,138	0,219	0,299	0,121	0,191	0,255
	0,023	0,137	0,218	0,302	0,121	0,190	0,254
Среднее	0,0235	0,1351	0,2176	0,2996	0,1200	0,1898	0,2554

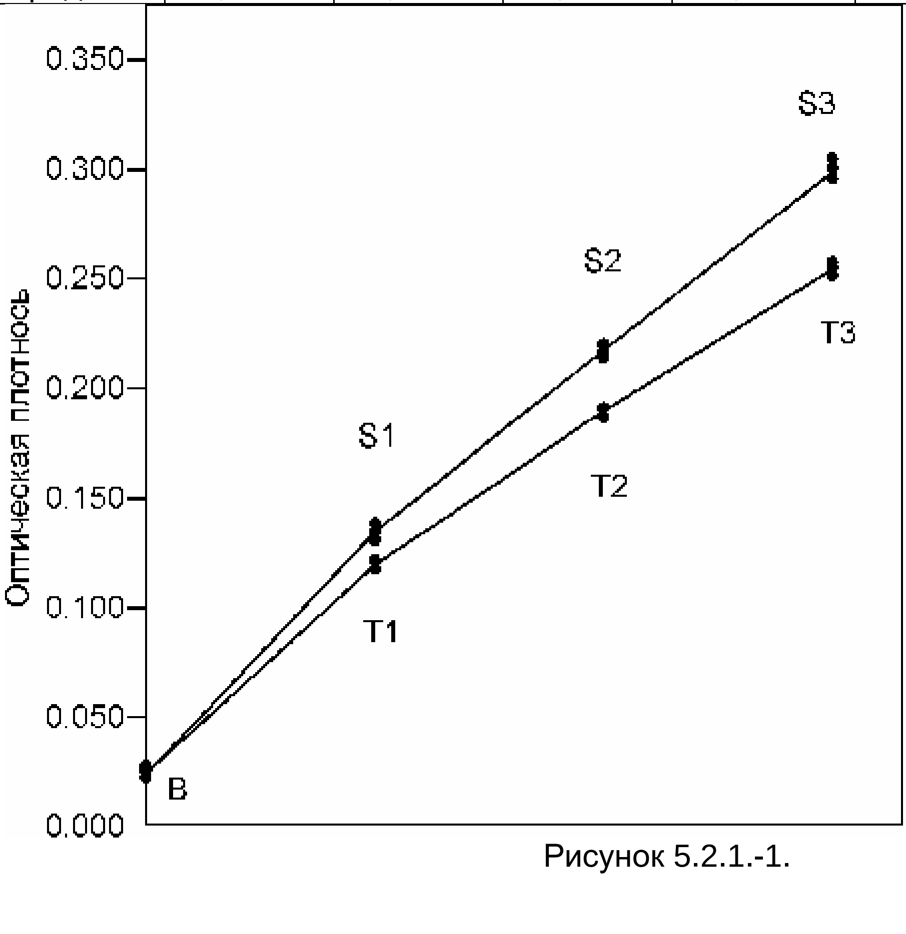


Рисунок 5.2.1.-1.

Таблица 5.2.1.-2.

Дисперсионный анализ

Источник вариации	Степени свободы	Сумма квадратов отклонений	Дисперсия (средний квадрат отклонения)	F-отношение	Вероятнос
Линейная регрессия Точки пересечения Нелинейность	2 1 2	0,1917 3×10^{-9} 2×10^{-5}	0,0958 3×10^{-9} 1×10^{-5}	24 850 7×10^{-4} 2,984	0,000 0,978 0,061
Группы Неисключенная погрешность	5 42	0,1917 $1{,}62\times10^{-4}$	 $3{,}86\times10^{-6}$		
Итого	47	0,1919			

5.2.2 (0,4,4,4) СХЕМА ПОЛНОЙ РАНДОМИЗАЦИИ

Количественное определение активности вакцины против гриппа in vitro

Содержание антигена гемаглютинина (НА) в двух вакцинах против гриппа определяли методом радиальной иммунодиффузии. На этикетках обеих вакцин была указана активность 15 мкг НА на одну дозу, что эквивалентно содержанию 30 мкг НА/мл. Стандартный препарат имел установленную активность 39 мкг НА/мл.

Исследовали четыре концентрации стандартной и испытуемой вакцин, рассчитанных исходя из предполагаемых и обозначенных на этикетке активностей; в каждом случае число повторений равно двум. После установления равновесия между внутренним и внешним реагентами, измерялась площадь кольцевых зон осадка. Результаты приведены в Таблице 5.2.2.-1.

Графическое представление данных не выявило никаких необычных особенностей расположения данных.

Используя формулы, приведенные в Таблицах 3.3.3.1-1 и 3.3.3.1.-2, получаем следующие результаты:

$P_S = 108{,}2$	$P_T = 103{,}85$	$P_U = 85{,}8$
$L_S = 301{,}1$	$L_T = 292{,}1$	$L_U = 234{,}1$
$a_S = 141{,}0$	$a_T = 116{,}7$	$a_U = 139{,}8$
$b_S = 61{,}2$	$b_T = 64{,}95$	$b_U = 39{,}2$
$G_S = 3114{,}3$	$G_T = 2909{,}4$	$G_U = 1917{,}3$
$J_S = 0{,}223$	$J_T = 2{,}227$	$J_U = 0{,}083$

и

$H_I = 0{,}0093$ $\qquad a' = 11{,}04$ $\qquad K = 14785{,}8$

Далее выполняют дисперсионный анализ по формулам, приведенным в Таблицах 3.3.3.1.-3 и 3.3.3.1.-4. Результаты представлены в Таблице 5.2.2.-2.

Высокая значимость регрессии и отсутствие значимых отклонений от линейности и точки пересечения позволяют рассчитать активность.

Угловой коэффициент стандартного препарата

$$b'_S = \frac{6\times301{,}1 - 60\times11{,}04}{180} = 6{,}356$$

Угловой коэффициент испытуемой вакцины *T*

$$b_T' = \frac{6\times 292{,}1 - 60\times 11{,}04}{180} = 6{,}056$$

Угловой коэффициент испытуемой вакцины *U*

$$b_U' = \frac{6\times 234{,}1 - 60\times 11{,}04}{180} = 4{,}123$$

В результате получаем следующие отношения активностей 6,056/6,356=0,953 для вакцины *T* и 4.123/6.356=0,649 для вакцины *U*.

$$C = \frac{6{,}356^2}{6{,}356^2 - 1{,}068\times 2{,}179^2\times 0{,}0444} = 1{,}0056$$

$$K' = 0{,}0056\times 0{,}625 = 0{,}0035$$

Доверительные интервалы вычисляют по формуле 3.3.5.1.-4.

Для вакцины T

$$0{,}955 \pm \sqrt{0{,}0056\times 1{,}913 + 0{,}0035\times(-1{,}913)} = 0{,}955 \pm 0{,}063$$

Для вакцины U

$$0{,}649 \pm \sqrt{0{,}0056\times 1{,}423 + 0{,}0035\times(-1{,}301)} = 0{,}649 \pm 0{,}058$$

Содержание НА в 1 мл вакцины находят путем умножения отношения активностей и доверительных интервалов на предполагаемую активность 30 мкг/мл. Результаты приведены в Таблице 5.2.2.-3.

Таблица 5.2.2.-1.

Площадь зоны осадка (мм^2)

Концентрация	Стандартный препарат S		Испытуемый препарат T		Испытуемый препарат U	
(мкг/мл)	I	II	I	II	I	II
7,5	18,0	18,0	15,1	16,8	15,4	15,7
15,0	22,8	24,5	23,1	24,2	20,2	18,6
22,5	30,4	30,4	28,9	27,4	24,2	23,1
30,0	35,7	36,6	34,4	37,8	27,4	27,0

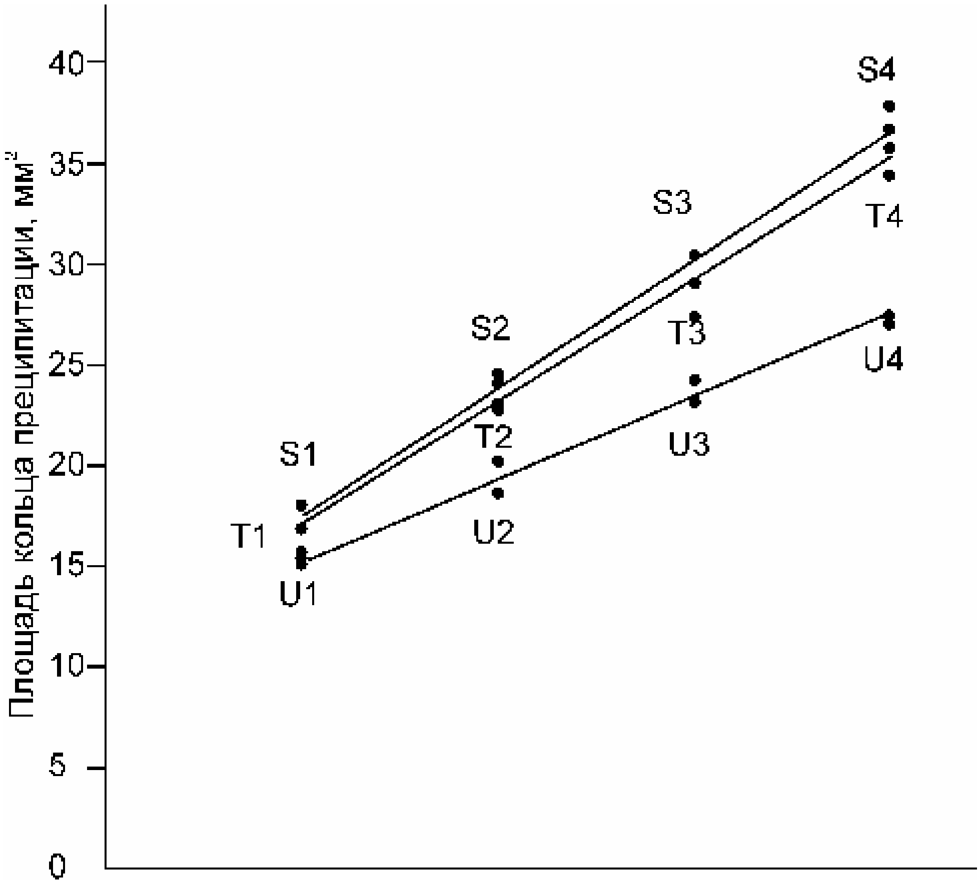


Рисунок 5.2.2.-1.

Таблица 5.2.2.-2.

Дисперсионный анализ

Источник вариации	Степени свободы	Сумма квадратов отклонений	Дисперсия (средний квадрат отклонения)	F-отношение	Вероятность
Линейная регрессия	3	1087,7	362,6	339,5	0,000
Точки пересечения	2	3,474	1,737	1,626	0,237
Нелинейность	6	5,066	0,844	0,791	0,594
Группы	11	1096,2			
Неисключенная погрешность	12	12,815	1,068		
Общая вариация	23	1109,0			

Таблица 5.2.2.-3.

Оценка содержания НА (мкг/доза)

	Нижняя граница	Оценка	Верхняя граница
Вакцина T	13,4	14,3	15,3
Вакцина U	8,9	9,7	10,6

5.3. АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ ЭФФЕКТЫ

5.3.1 ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ПРОБИТ-АНАЛИЗА ПРИ СРАВНЕНИИ ИСПЫТУЕМОГО ПРЕПАРАТА СО СТАНДАРТНЫМ

Количественное определение вакцины против дифтерии in vitro

Выполняли количественное определение вакцины против дифтерии (предполагаемая активность 140 МЕ/флакон) по отношению к стандартному препарату (установленная активность 132 МЕ/флакон). На основании этих данных готовили эквивалентные дозы и вводили случайным образом группам морских свинок. Через определенный период времени после введения, это вызывало гибель животных вследствие поражения дифтерийным токсином. Подсчитывали число выживших свинок. Полученные результаты приведены в Таблице 5.3.1.-1.

Затем эти результаты переносили в первую рабочую таблицу, остальные ее столбцы заполняют в соответствии с рекомендациями, приведенными в Разделе 4.2.1. В Таблице 5.3.1.-2. приведены результаты первого цикла процедуры итерационного анализа.

Далее суммируют данные последних шести столбцов для каждого из препаратов и результаты заносят во вторую рабочую таблицу (см. Таблицу 5.3.1.-3). Остальные столбцы заполняют данными, полученными при использовании формул 4.2.1.-4. – 4.2.1.-10. В результате получают значение общего углового коэффициента *b*, равное 1,655.

Далее значения *Y* первой рабочей таблицы заменяют значениями *a*+*bx* и выполняют второй цикл (см. Таблицу 5.3.1.-4).

Циклы повторяют до тех пор, пока разница между результатами двух последовательных циклов не станет достаточно маленькой. В результате получают вторую рабочую Таблицу 5.3.1.-5.

Проверку линейности проводят как описано в Разделе 4.2.2. Значение χ^2 для 4 степеней свободы равно 0,851+1,070=1,921, чему соответствует значение *p*=0,750, которое не является статистически значимым.

Поскольку отклонение от линейности не является статистически значимым, проверку отклонения от параллельности можно выполнить, как описано в том же разделе. Значение χ^2 для 1 степени свободы равно

$$(16{,}71 + 17{,}27) - \frac{14{,}15^2}{5{,}89} = 0{,}001,$$

чему соответствует значение *p*=0,974, которое также не является статистически значимым.

Таблица 5.3.1.-1.

Исходные данные для количественного определения

Стандартный препарат (S) Установленная активность 132 МЕ/флакон			Испытуемый препарат (T) Предполагаемая активность 140 МЕ/флакон		
Доза (МЕ/мл)	Число зараженных животных	Число выживших	Доза (МЕ/мл)	Число зараженных животных	Число выживших
1,0	12	0	1,0	11	0
1,6	12	3	1,6	12	4
2,5	12	6	2,5	11	8
4,0	11	10	4,0	11	10

Теперь натуральный логарифм отношения активностей может быть рассчитан, как описано в Разделе 4.2.3.

$$M'_T = \frac{-1{,}721-(-2{,}050)}{2{,}401} = 0{,}137$$

Далее

$$C = \frac{2{,}401^2 \times 5{,}893}{2{,}401^2 \times 5{,}893 - 1^2 \times 1{,}960^2} = 1{,}127$$

$$V = \frac{1}{18{,}37} + \frac{1}{17{,}96} = 0{,}110$$

Натуральный логарифм доверительного интервала:

$$0{,}155 - 0{,}013 \pm \sqrt{0{,}127(0{,}649 + 1{,}127 \times 0{,}036^2)} = 0{,}142 \pm 0{,}288$$

Вычислив антилогарифм и умножив полученное значение на предполагаемую активность 40 МЕ/флакон, получим оценку активности 160,6 МЕ/флакон и 95% доверительный интервал от 121,0 до 215,2 МЕ/флакон.

Таблица 5.3.1.-2.

Первая рабочая таблица для первого цикла итерации

Вакцина	*Доза*	*n*	*r*	*x*	*p*	*Y*	*Ф*	*Z*	*y*	*w*	*wx*	*wy*	wx^2	wy^2	*wx*
S	1,0	12	0	0,000	0,000	0	0,5	0,399	− 1,253	7,64	0,00	− 9,57	0,00	12,00	0,0
	1,6	12	3	0,470	0,250	0	0,5	0,399	− 0,627	7,64	3,59	− 4,79	1,69	3,00	− 2,
	2,5	12	6	0,916	0,500	0	0,5	0,399	0,000	7,64	7,00	0,00	6,41	0,00	0,0
	4,0	11	10	1,386	0,909	0	0,5	0,399	1,025	7,00	9,71	7,18	13,46	7,36	9,9
T	1,0	11	0	0,000	0,000	0	0,5	0,399	− 1,253	7,00	0,00	− 8,78	0,00	11,00	0,0
	1,6	12	4	0,470	0,333	0	0,5	0,399	− 0,418	7,64	3,59	− 3,19	1,69	1,33	− 1,
	2,5	11	8	0,916	0,727	0	0,5	0,399	0,570	7,00	6,42	3,99	5,88	2,27	3,6
	4,0	11	10	1,386	0,909	0	0,5	0,399	1,025	7,00	9,71	7,18	13,46	7,36	9,9

Таблица 5.3.1.-3.

Вторая рабочая таблица для первого цикла итерации

Вакцина	Σω	Σωx	Σωy	$\Sigma\omega x^2$	$\Sigma\omega y^2$	Σωxy	S_{xx}	S_{xy}	S_{yy}	$\bar{x}$	$\bar{y}$	a
S	29,92	20,30	− 7,18	21,56	22,36	7,70	7,79	12,58	20,64	0,68	− 0,24	− 1,36
T	28,65	19,72	− 0,80	21,03	21,97	12,11	7,46	12,66	21,95	0,69	− 0,03	− 1,17

Таблица 5.3.1.-4.

Первая рабочая таблица для второго цикла итерации

Вак-цина	Доза	n	r	x	p	Y	Φ	Z	y	w	wx	wy	wx^2	wy^2	v
S	1.0	12	0	0.000	0.000	−1.36	0.086	0.158	−1.911	3.77	0.00	− 7.21	0.00	13.79	0
	1.6	12	3	0.470	0.250	− 0.58	0.279	0.336	− 0.672	6.74	3.17	− 4.53	1.49	3.04	−
	2.5	12	6	0.916	0.500	0.15	0.561	0.394	− 0.001	7.57	6.94	− 0.01	6.36	0.00	−
	4.0	11	10	1.386	0.909	0.93	0.824	0.258	1.260	5.07	7.03	6.39	9.75	8.05	8
T	1.0	11	0	0.000	0.000	− 1.17	0.122	0.202	− 1.769	4.20	0.00	− 7.43	0.00	13.14	0
	1.6	12	4	0.470	0.333	− 0.39	0.349	0.370	− 0.430	7.23	3.40	− 3.11	1.60	1.34	−
	2.5	11	8	0.916	0.727	0.35	0.637	0.375	0.591	6.70	6.14	3.96	5.62	2.34	3
	4.0	11	10	1.386	0.909	1.13	0.870	0.211	1.311	4.35	6.03	5.70	8.36	7.48	7

Таблица 5.3.1.-5.

Вторая рабочая таблица после достаточного количества циклов итерации

Вакцина	Σω	Σωx	Σωy	$\Sigma\omega x^2$	$\Sigma\omega y^2$	Σωxy	S_{xx}	S_{xy}	S_{yy}	$\bar{x}$	$\bar{y}$	a
S	18,37	14,80	− 2,14	14,85	17,81	5,28	2,93	7,00	17,56	0,81	− 0,12	− 2,05
T	17,96	12,64	− 0,55	11,86	18,35	6,76	2,96	7,15	18,34	0,70	− 0,03	− 1,72

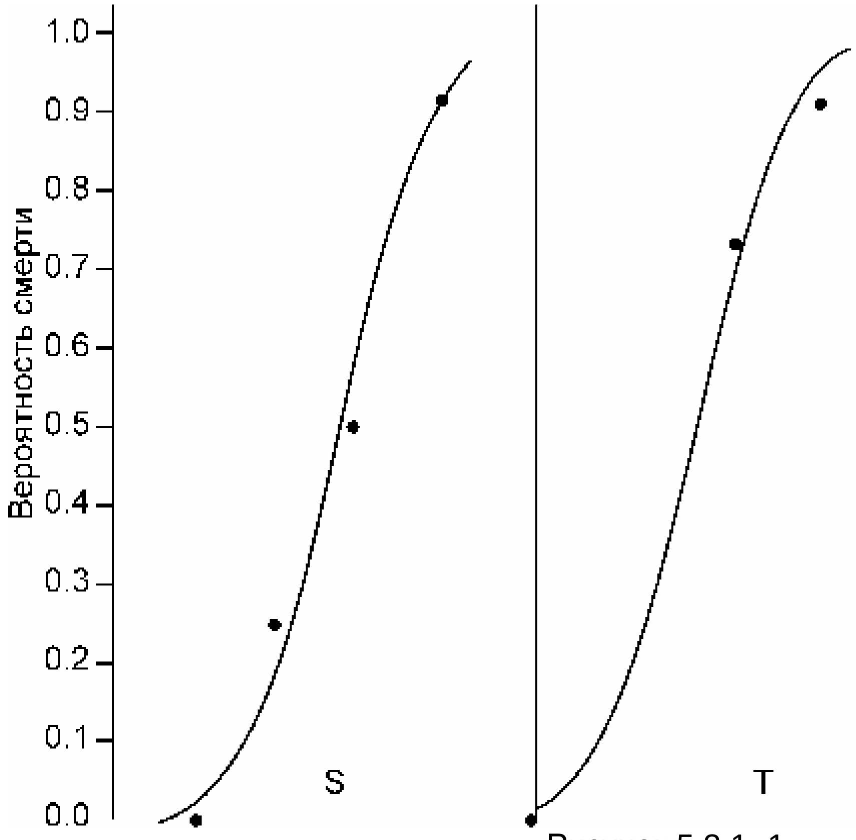


Рисунок 5.3.1.-1.

5.3.2 *ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ЛОГИТ-АНАЛИЗА И ДРУГИХ АНАЛОГИЧНЫХ МЕТОДОВ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРИ СРАВНЕНИИ ИСПЫТУЕМОГО ПРЕПАРАТА СО СТАНДАРТНЫМ ПРЕПАРАТОМ*

Результаты будут описаны для случая, в котором метод логит-анализа и другие «классические» методы данного типа используют данные, предоставленные в Разделе 5.3.1. В данной конкретной ситуации приведенный материал следует рассматривать как упражнения, а не в качестве альтернативного методу пробит-анализа. Другая форма кривой может быть принята только в том случае, если необходимость замены подтверждается экспериментальными данными или теоретическими расчетами.

Таблица 5.3.2.-1.

Результаты, полученные при использовании альтернативных методов анализа

	Логит	Гомпит	Угловой[(*)]
Ф	$\frac{1}{1+e^{-Y}}$	$1-e^{-e^{Y}}$	$\frac{1}{2}\sin Y+\frac{1}{2}$
Z	$\frac{e^{-Y}}{(1+e^{-Y})^2}$	$e^{Y-e^{Y}}$	$\frac{1}{2}\cos Y$
Угловой коэффициент b	4.101	2.590	1.717
χ^2 (линейность)	2.15	3.56	1.50
χ^2 (параллельность)	0.0066	0.168	0.0010
Активность	162.9	158.3	155.8
Нижняя граница	121.1	118.7	122.6
Верхняя граница	221.1	213.3	200.7

(*) $$\begin{cases} \Phi = 0 \quad и \quad Z = 0, \quad при Y < -\frac{1}{2}p \\ \Phi = 1 \quad и \quad Z = 0, \quad при Y > \frac{1}{2}p \end{cases}$$

5.3.3 *ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭД$_{50}$ ВЕЩЕСТВА, ИСПОЛЬЗУЯ МЕТОД ПРОБИТ-АНАЛИЗА*

Количественное определение in vivo вакцины против полиомиелита, применяемой орально

Для количественного определения ЕД$_{50}$ вакцины против полиомиелита было исследовано 10 различных разведений 50 мкл исходной вакцины на чашках Элиса по 8 повторений в каждом случае. Полученные результаты приведены в Таблице 5.3.3.-1.

Таблица 5.3.3.-1.

Разведения (10´ мкл исходной вакцины)

− 3,5	− 4,0	− 4,5	− 5,0	− 5,5	− 6,0	−6,5	−7,0	−7,5	−8,0
+	+	+	+	−	−	−	−	−	−
+	+	+	+	−	−	−	−	−	−
+	+	−	−	−	−	−	−	−	−
+	+	+	+	−	−	−	−	−	−
+	+	+	−	−	−	−	−	−	−
+	+	+	+	+	−	−	−	−	−
+	+	+	+	+	−	+	−	−	−
+	+	+	+	−	+	−	−	−	−

Полученные результаты заносят в первую рабочую таблицу, а остальные ее столбцы заполняют как описано в Разделе 4.2.1. В Таблице 5.3.3.-2 приведены результаты первого цикла процедуры итерации, описанной в данном разделе.

Таблица 5.3.3.-2.

Первая рабочая таблица для первого цикла

Вакцина	*Доза*	*n*	*r*	*x*	*p*	*Y*	*Ф*	*Z*	*y*	*w*	*wx*	*wy*	wx^2	wy^2	*wxy*
Т	$10^{-3,5}$	8	0	– 8,06	0,000	0,00	0,5	0,399	– 1,253	5,09	– 41,04	– 6,38	330,8	8,00	51,4
	$10^{-4,0}$	8	0	– 9,21	0,000	0,00	0,5	0,399	– 1,253	5,09	– 46,91	– 6,38	432,0	8,00	58,8
	$10^{-4,5}$	8	1	– 10,36	0,125	0,00	0,5	0,399	– 0,940	5,09	– 52,77	– 4,79	546,8	4,50	49,6
	$10^{-5,0}$	8	2	– 11,51	0,250	0,00	0,5	0,399	– 0,627	5,09	– 58,63	– 3,19	675,1	2,00	36,7
	$10^{-5,5}$	8	6	– 12,66	0,750	0,00	0,5	0,399	0,627	5,09	– 64,50	3,19	816,8	2,00	– 40,
	$10^{-6,0}$	8	7	– 13,82	0,875	0,00	0,5	0,399	0,940	5,09	– 70,36	4,79	972,1	4,50	– 66,
	$10^{-6,5}$	8	7	– 14,97	0,875	0,00	0,5	0,399	0,940	5,09	– 76,23	4,79	1140,8	4,50	– 71,
	$10^{-7,0}$	8	8	– 16,12	1,000	0,00	0,5	0,399	1,253	5,09	– 82,09	6,38	1323,1	8,00	– 102,
	$10^{-7,5}$	8	8	– 17,27	1,000	0,00	0,5	0,399	1,253	5,09	– 87,95	6,38	1518,9	8,00	– 110,
	$10^{-8,0}$	8	8	– 18,42	1,000	0,00	0,5	0,399	1,253	5,09	– 93,82	6,38	1728,2	8,00	– 117,

Затем данные оставшихся шести столбцов суммируют для каждого из препаратов и результаты заносят во вторую рабочую таблицу (см. Таблицу 5.3.3.-3). Остальные столбцы заполняют данными, рассчитанными по формулам 4.2.1.-4 – 4.2.1.-10. В результате получают общий угловой коэффициент *b*, равный –0,295.

Таблица 5.3.3.-3.

Вторая рабочая таблица для первого цикла

Вакцина	Σw	Σwx	Σwy	Σwx^2	Σwy^2	Σwxy	S_{xx}	S_{xy}	S_{yy}	$\bar{x}$	$\bar{y}$	a
Т	50.93	– 674.3	11.17	9484.6	57.50	– 312.32	556.92	– 164.43	55.05	– 13.24	0.219	– 3.690

Далее значения *Y* первой рабочей таблицы заменяют на значения *a*+*bx* и выполняют второй цикл итерации. Циклы повторяют до тех пор, пока разница между результатами двух последовательных циклов не станет достаточно маленькой. В результате получают вторую рабочую Таблицу 5.3.3.-4.

Таблица 5.3.3.-4.

Вторая рабочая таблица после проведения достаточного числа циклов

Вакцина	Σω	Σωx	Σωy	$\Sigma\omega x^2$	$\Sigma\omega y^2$	Σωxy	S_{xx}	S_{xy}	S_{yy}	$\bar{x}$	$\bar{y}$	a
Т	19,39	– 238,2	0,11	2981,1	26,05	– 37,45	55,88	– 36,11	26,05	– 12,28	0,006	– 7,

Проверку линейности проводят как описано в Разделе 4.2.2. Значение χ^2 для 8 степеней свободы равно 2.711, чему соответствует значение *p*=0,951, которое не является статистически значимым.

Теперь оценка отношения активностей может быть получена, как описано в Разделе 4.5.

$$M_T' = \frac{-(-7{,}931)}{-0{,}646} = -12{,}273$$

Далее

$$C = \frac{(-0{,}646)^2 \times 55{,}883}{(-0{,}646)^2 \times 55{,}883 - 1^2 \times 1{,}960^2} = 1{,}197$$

$$V = \frac{1}{19{,}39} = 0{,}052$$

Натуральный логарифм доверительного интервала

$$-14{,}692 - (-2{,}420) \pm \sqrt{0{,}197 \times (2{,}882 + 1{,}197 \times 0{,}009^2} = -12{,}272 \pm 0{,}754$$

Эта оценка все еще выражена в виде натурального логарифма разведений. Для того, чтобы выразить активность в *ln*(ЕД$_{50}$)/мл, результаты преобразуют в

$$-M_T' + \ln\left(\frac{1000}{50}\right).$$

Поскольку активность такого типа вакцин обычно выражают с использованием десятичного логарифма log$_{10}$(ЕД$_{50}$)/мл, полученный результат следует разделить на ln(10). В результате получим оценку активности 6.36 log$_{10}$(ЕД$_{50}$)/мл при 95% доверительном интервале 6.30-6.96log$_{10}$(ЕД$_{50}$)/мл.

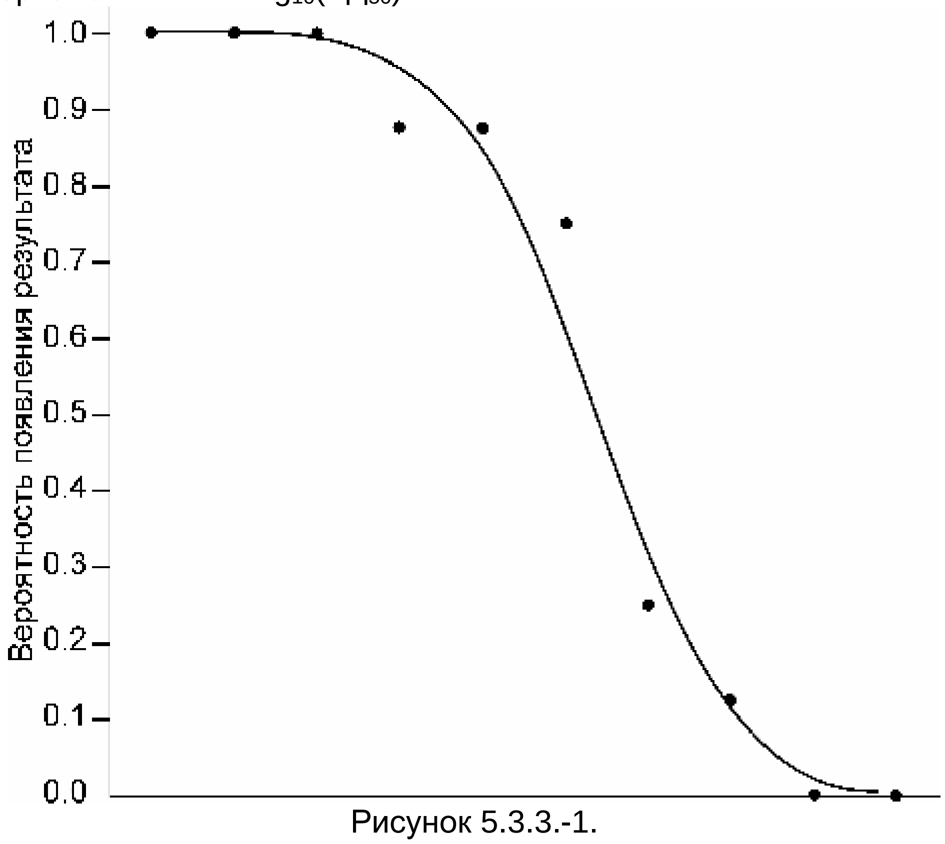


Рисунок 5.3.3.-1.

6 ОБЪЕДИНЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ

6.1. ВВЕДЕНИЕ

С целью удовлетворения требованиям Фармакопеи, часто необходимо повторение независимых количественных определений и объединение полученных результатов. В связи с этим возникает вопрос, в каких случаях возможно объединение результатов и каким образом это осуществляется.

Два количественных определения могут быть рассмотрены как действительно независимые, если выполнение любого из них не влияет на вероятности появления

возможных результатов другого. Это означает, что случайные ошибки всех существенных факторов, которые могут повлиять на результат в ходе выполнения одного количественного определения (например, разведения стандартного и испытуемого препаратов, чувствительность биологических индикаторов), не зависят от соответствующих случайных ошибок этих факторов в ходе выполнения другого количественного определения. Таким образом, количественные определения, которые проводятся в последующие дни с использованием одинаковых сохраненных разведений стандартного препарата не являются независимыми.

Существует несколько методов объединения результатов независимых количественных определений, наиболее приемлемый из них с теоретической точки зрения является довольно сложным при практическом использовании. Ниже описаны три простых метода аппроксимации; однако могут использоваться и другие методы, если выполнены необходимые условия объединения результатов.

Если данные количественного определения основываются на использовании модели параллельных линий или модели пробит-анализа, полученные значения активностей перед объединением необходимо представить в логарифмическом виде; значения активностей, полученные при использовании модели угловых коэффициентов, объединяют без преобразований. Поскольку модель параллельных линий используют чаще, чем модель угловых коэффициентов, в данном разделе в формулах используется символ *M,* обозначающий натуральный логарифм отношения активностей. Подставляя вместо *M* отношения угловых коэффициентов *R*, можно применять те же формулы для определения активностей, найденных при использовании модели угловых коэффициентов. Перед объединением оценки активностей всех исследованных препаратов должны быть скорректированы по отношению к установленной активности.

6.2. ВЗВЕШЕННОЕ ОБЪЕДИНЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Данный метод может быть использован только в том случае, если выполняются следующие условия:

1) оценки активностей получены в ходе независимых количественных определений;
2) для каждого из количественных определений значение C близко к 1 (другими словами, меньше чем 1.1);
3) число степеней свободы конкретных неисключенных погрешностей не меньше 6, но желательно, чтобы оно было больше 15;
4) оценки конкретных активностей образуют однородное множество (см. Раздел 6.2.2).

Если эти условия не выполняются, метод нельзя использовать. В этом случае для нахождения наилучшей оценки средней активности, которая затем будет применяться в последующих количественных определениях в качестве предполагаемой активности, может использоваться метод, описанный в Разделе 6.3.

6.2.1. РАСЧЕТ ВЕСОВЫХ КОЭФФИЦИЕНТОВ

Предположим, что проведено n’ количественных определений, в ходе которых получено *n’* значений *M* с соответствующими доверительными интервалами. Для каждого количественного определения рассчитывается логарифмический доверительный интервал *L* путем вычитания нижнего значения от верхнего. Вес *W* для каждого значения *M* вычисляется по формуле 6.2.1.-1, где *t* имеет то же значение, которое используется при расчете доверительных интервалов.

$$W = \frac{4t^2}{L^2} \qquad (6.2.1.\text{-}1)$$

6.2.2. ОДНОРОДНОСТЬ ОЦЕНОК АКТИВНОСТИ

Однородность оценок активностей определяют следующим образом. Отклонение каждого из значений *M* от взвешенного среднего возводят в квадрат, умножают на соответствующий вес и суммируют по всем количественным определениям. В результате получают статистику, приблизительно распределенную как χ^2, и которая может использоваться для оценки однородности множества натуральных логарифмов оценок активностей:

$$\chi^2 \approx \sum_{n'} W(M - \overline{M})^2 \qquad (6.2.2.1)$$

где

$$\overline{M} = \frac{\sum WM}{\sum W}$$

Если рассчитанное значение χ^2 меньше табличного значения, соответствующего (n'-1) степеням свободы, то активности однородны, и среднее значение активности, а также доверительные интервалы, рассчитанные при помощи метода, описанного в Разделе 6.2.3 будут обоснованными.

Если рассчитанное значение статистики больше табличного, активности неоднородны. Это означает, что отклонение между конкретными оценками *M* больше, чем можно было бы ожидать, исходя из оценок доверительных интервалов. То есть между количественными определениями существует значительная вариабельность. В этом случае условие 4 не выполняется и формулы, приведенные в Разделе 6.2.3 не применимы. Вместо них могут быть использованы формулы, приведенные в Разделе 6.2.4.

6.2.3. РАСЧЕТ ВЗВЕШЕННОГО СРЕДНЕГО И ГРАНИЦ ДОВЕРИТЕЛЬНЫХ ИНТЕРВАЛОВ

Для каждого количественного определения рассчитывают значения *WM*, а их сумму делят суммарный вес всех количественных определений. В результате получают значение логарифма взвешенной средней активности

$$\overline{M} = \frac{\sum WM}{\sum W} \qquad (6.2.3.\text{-}1)$$

стандартная ошибка натурального логарифма средней активности вычисляется как квадратный корень из величины, обратной суммарному весу:

$$s_{\overline{M}} = \sqrt{\frac{1}{\sum W}} \qquad (6.2.3.\text{-}2)$$

а приблизительный доверительный интервал равен антилогарифму значения

$$\overline{M} \pm t s_{\overline{M}} \qquad (6.2.3.\text{-}3)$$

где число степеней свободы t равно сумме чисел степеней свободы средних квадратов ошибок отдельных количественных определений.

6.2.4. ВЗВЕШЕННОЕ СРЕДНЕЕ И ДОВЕРИТЕЛЬНЫЕ ИНТЕРВАЛЫ ОТКЛОНЕНИЯ В ПРЕДЕЛАХ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ И МЕЖДУ НИМИ.

При объединении результатов нескольких повторных количественных определений, величина χ^2 может быть значимой. В этом случае полученная вариация имеет два компонента:

- вариация в пределах серии количественных определений $s_M^2 = 1/W$
- вариация между сериями количественных определений

$$- \quad s_{\overline{M}}^2 = \frac{\sum (M - \overline{M})^2}{n'(n'-1)}$$

где :

$\overline{M}$ – невзвешенное среднее значение.

Первый компонент изменяется от одного количественного определения до другого, тогда как второй компонент является общим для всех *M*.

Тогда для каждого значения *M* рассчитывают весовой коэффициент

$$W' = \frac{1}{s_M^2 + s_{\overline{M}}^2},$$

который заменяет значение *W* в Разделе 6.2.3; *t* прибизительно равно 2.

6.3. НЕВЗВЕШЕННОЕ ОБЪЕДИНЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Наиболее простым способом объединения n' оценок для значений M при n' коичественных определениях, является вычисление среднего значения и оценка стандартного отклонения по формуле

$$s_{\overline{M}}^2 = \frac{\sum (M - \overline{M})^2}{n'(n'-1)} \qquad (6.3.\text{-}1)$$

а доверительный интервал

$$\overline{M} \pm t s_{\overline{M}} \qquad (6.3.\text{-}2)$$

где *t* имеет (n'-1) степеней свободы. Число *n'* оценок значений *M* обычно мало, а значение *t*, соответсвенно, довольно велико.

6.4. ПРИМЕР ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВЗЕШЕННОЙ СРЕДНЕЙ АКТИВНОСТИ С ДОВЕРИТЕЛЬНІМ ИНТЕРВАЛОМ

В таблице 6.4.-1 приведено шесть независимых оценок активности одного и того же препарата, а также их доверительные интервалы и число степеней свободы для их дисперсий ошибки. Условия 1,2 и 3, приведенные в Разделе 6.2., выполнены. Натуральный логарифм активностей и веса рассчитаны, как описано в Разделе 6.2.

Таблица 6.4.-1.

Оценки активностей и доверительные интервалы шесит независимых количественных определений

Оценка активности (МЕ/флакон)	Нижняя граница (МЕ/флакон)	Верхняя граница (МЕ/флакон)	Степени свободы	Натуральный логарифм активности M	Вес *W*
18 367	17 755	19 002	20	9,8183	3777,7
18 003	17 415	18 610	20	9,7983	3951,5
18 064	17 319	18 838	20	9,8017	2462,5
17 832	17 253	18 429	20	9,7887	4003,0
18 635	17 959	19 339	20	9,8328	3175,6
18 269	17 722	18 834	20	9,8130	4699,5

Однородность оценок активностей рассчитывают по формуле 6.2.2.-1, в результате получают значение c^2, равное 4,42 при 5 степенях свободы. Этот результат не является статистически значимым (p=0,49) и, следовательно, все условия для применения оценки взвешенной средней активности выполняются.

Взвешенную среднюю активность вычисляют по формуле 6.2.3.-2, в результате получают значение 9,8085.

По формуле 6.2.3.-2 рассчитывают стандартное отклонение, равное 0,00673, а по формуле 6.2.3.-3 вычисляют 95% доверительный интервал 9,7951 – 9,8218, где t имеет 120 степеней свободы.

Взяв антилогарифм, получают значение активности, равное 18187 МЕ/флакон при 95% доверительном интервале от 17946 до 18431 МЕ/флакон.

7. ДОПОЛНЕНИЕ

Невозможно дать исчерпывающий обзор статистических методов, используемых при проведении фармакопейных исследований. Тем не менее методы, изложенные в данной статье, удовлетворяют требованиям большинства фармакопейных целей. В данном разделе сделана попытка представить более абстрактный обзор альтернативных или наиболее общих методов статистического анализа. Заинтересованные лица могут также обратиться к специальной литературе по этой теме. В случае использования более специализированных методов статистического анализа, следует обратиться за помощью к квалифицированным специалистам.

7.1. ОБЩИЕ ЛИНЕЙНЫЕ МОДЕЛИ

Методы, изложенные в данной статье, могут быть описаны в рамках общих линейных моделей (или обобщенных линейных моделей для того, чтобы включить методы пробит и логит-анализа). Принцип основан на построении линейной матрицы структуры *X* (или матрицы планирования), в которой каждая строка представляет результаты наблюдения, а каждый столбец – один из линейных факторов (препарат, блок, столбец, дозу). Например, в случае схемы латинского квадрата, рассмотренной в Разделе 5.1.2, такая матрица состояла бы из 36 строк и 13 столбцов. По одному столбцу на каждый из препаратов, один столбец для доз, пять столбцов на каждый из блоков, за исключением первого, и пять столбцов для каждой строки, за исключением первой. Все столбцы, за исключением одного для доз, заполняют 0 или 1 в зависимости от того, связано данное наблюдение с данным фактором или нет. Вектор *Y* заполняют результатами наблюдений (преобразованными). Искомые параметры вычисляют по формуле $(X^tX)^{-1}X^tY$, после чего оценка активности *m* может быть легко получена как от-

ношение соответствующих параметров. Доверительные интервалы рассчитываются на основе теоремы Филлера (Fieller):

$$m_L, m_U = \frac{\left[m - \frac{g v_{12}}{v_{22}} \pm \frac{ts}{b} \sqrt{v_{11} - 2mv_{12} + m^2 v_{22} - g\left(v_{11} - \frac{v_{12}^2}{v_{22}} \right)} \right]}{(1-g)}$$

где :

$$g = \frac{t^2 s^2 v\upsilon_{22}}{b^2}$$

а v_{11}, v_{22} – множители дисперсии знаменателя и числителя, соответственно; v_{12} – множитель ковариации. Эти множители можно непосредственно вычислить из матрицы $(X^t X)^{-1}$, или косвенным методом, приняв во внимание, что $Var(a_1\text{-}a_2)=Var(a_1)+Var(a_2)\text{-}2Cov(a_1,a_2)$, а $Cov(a_1\text{-}a_2,b)=Cov(a_1,b)\text{-}Cov(a_2,b)$.

Полный дисперсионный анализ с полным разделением компонентов более сложен, поскольку он предполагает пересмотр матрицы X, к которой при этом дополняются столбцы для ослабления предположений о параллельности и линейности, после чего может быть проверена гипотеза о линейности. В случае количественных определений, зависящих от альтернативных эффектов, факторы линейности (точки пересечения с осью ординат a_S, a_T и т.д. общий угловой коэффициент b) находят путем максимизации суммы по группам препаратов $n\ln\Phi(a_i+bx)+(n-r)\ln(1-\Phi(a_i+bx))$, где x – натуральный логарифм дозы (ln(доза)), Φ – определяет форму распределения, $i \in \{S,T,\ldots\}$.

7.2. НЕОДНОРОДНОСТЬ ДИСПЕРСИИ

Проблема неоднородности дисперсии не всегда может быть решена путем простого преобразования результатов. В этом случае один из возможных способов решения данной проблемы состоит в применении метода взвешенной линейной регрессии. Чтобы получить объективную оценку, веса результатов наблюдений берутся как величины обратно пропорциональные дисперсии ошибок. Так как истинное значение дисперсии ошибок не всегда известно, веса могут подбираться с использованием линейной итеративной процедуры. Однако при расчете доверительных интервалов при этом возникают дополнительные проблемы.

7.3. ВЫБРОСЫ И УСТОЙЧИВОСТЬ МЕТОДОВ В РАБОТЕ (РОБАСТНОСТЬ)

Недостатком метода наименьших квадратов, описанного в данном приложении, является его довольно высокая чувствительность к резко отклоняющимся от среднего данным. Очевидный выброс может целиком исказить результаты вычислений. Эту проблему часто решают путем исключения выбросов из набора данных. Такой подход может привести к субъективному исключению данных – не всегда корректному и безопасному. Довольно сложно дать общие рекомендации, касающиеся решения относительно того является ли конкретный результат наблюдения выбросом или нет, и с этим связано появление и развитие ряда робастных (устойчивых в работе) методов анализа. Эти методы менее чувствительны к выбросам, за счет того, что результатам, которые в большей мере отличаются от прогнозируемого значения, придается меньший вес. В данном случае возникает ряд новых проблем, связанных с расчетом доверительных интервалов, а так же с определением подходящей функции для минимизации ошибок.

7.4. ОШИБКИ КОРРЕЛЯЦИИ

С практической точки зрения случаях полная рандомизация не всегда бывает осуществима или в некоторых крайне нежелательна. Поэтому для последовательных доз в пределах серии разведений часто характерны ошибки корреляции, которые приводят к чрезмерному сужению доверительных интервалов. Существует несколько методов, которые позволяют оценить такой эффект «автокорреляции».

8. ТАБЛИЦЫ И ПРОЦЕДУРЫ ГЕНЕРИРОВАНИЯ

В данном разделе приведены таблицы, в которых указаны критические значения для наиболее часто встречающихся оценок степеней свободы. Если необходимое значение отсутствует в таблице, следует обратиться к более полным таблицам. Статистические функции включены во многие компьютерные программы, которые могут быть использованы вместо таблиц. В качестве альтернативы могут использоваться приведенные после каждой таблицы процедуры генерирования, которые позволяют рассчитать вероятность, соответствующую заданной статистике и заданному числу степеней свободы.

8.1. *F*-РАСПРЕДЕЛЕНИЕ

Если полученное значение превышает табличное, оно рассматривается как значимое (верхняя строка, p=0,05), либо как высоко значимое (нижняя строка, p=0,01). *Df*1 – число степеней свободы числителя, *df*2 – число степеней свободы знаменателя.

Df1 / *df2*	1	2	3	4	5	6	8	10	12	15	20	∞
10	4,965	4,103	3,708	3,478	3,326	3,217	3,072	2,978	2,913	2,845	2,774	2,538
	10,044	7,559	6,552	5,994	5,636	5,386	5,057	4,849	4,706	4,558	4,405	3,909
12	4,747	3,885	3,490	3,259	3,106	2,996	2,849	2,753	2,687	2,617	2,544	2,296
	9,330	6,927	5,953	5,412	5,064	4,821	4,499	4,296	4,155	4,010	3,858	3,361
15	4,543	3,682	3,287	3,056	2,901	2,790	2,641	2,544	2,475	2,403	2,328	2,066
	8,683	6,359	5,417	4,893	4,556	4,318	4,004	3,805	3,666	3,522	3,372	2,868
20	4,351	3,493	3,098	2,866	2,711	2,599	2,447	2,348	2,278	2,203	2,124	1,843
	8,096	5,849	4,938	4,431	4,103	3,871	3,564	3,368	3,231	3,088	2,938	2,421
25	4,242	3,385	2,991	2,759	2,603	2,490	2,337	2,236	2,165	2,089	2,007	1,711
	7,770	5,568	4,675	4,177	3,855	3,627	3,324	3,129	2,993	2,850	2,699	2,169
30	4,171	3,316	2,922	2,690	2,534	2,421	2,266	2,165	2,092	2,015	1,932	1,622
	7,562	5,390	4,510	4,018	3,699	3,473	3,173	2,979	2,843	2,700	2,549	2,006
50	4,034	3,183	2,790	2,557	2,400	2,286	2,130	2,026	1,952	1,871	1,784	1,438
	7,171	5,057	4,199	3,720	3,408	3,186	2,890	2,698	2,563	2,419	2,265	1,683
∞	3,841	2,996	2,605	2,372	2,214	2,099	1,938	1,831	1,752	1,666	1,571	1,000
	6,635	4,605	3,782	3,319	3,017	2,802	2,511	2,321	2,185	2,039	1,878	1,000

Процедура генерирования: Примем *F* равным *F*-отношению, а *df1* и *df2* присвоим те же значения, как описано выше. Пусть π= 3.14159265358979… . Тогда генерирование *p*-значения статистики будет выполняться следующей процедурой.

Если *df* парное	Если *df1* непарное, а *df2*	Если *df1*и *df2* непарные

	парное	
x=df1/(df1+df2/F) s=1 t=1 for i=2 to (df1-2) step 2 t=t*x*(df2+i-2)/i s=s+t next i p=s*(1-x)^(df2/2)	x=df2/(df2+df1*F) s=1 t=1 for i=2 to (df2-2) step 2 t=t*x*(df1+i-2)/i s=s+t next i p=1-s*(1-x)^(df1/2)	x=atn(sqr(df1*F/df2)) cs=cos(x): sn=sin(x) x=x/2 s=0: t=sn*cs/2: v=0 w=1 for i=2 to (df2-1) step 2 s=s+t t=t*i/(i+1)*cs*cs next i for i=1 to (df1-2) step 2 v=v+w w=w*(df2+i)/(i+2)*sn*sn next i p=1+(t*df2*v-x-s)/pi*4

8.2. *t*-РАСПЕРЕДЕЛЕНИЕ

df	p = 0,05	p = 0,01	df	p = 0,05	p = 0,01
1	12,706	63,656	22	2,074	2,819
2	4,303	9,925	24	2,064	2,797
3	3,182	5,841	26	2,056	2,779
4	2,776	4,604	28	2,048	2,763
5	2,571	4,032	30	2,042	2,750
6	2,447	3,707	35	2,030	2,724
7	2,365	3,499	40	2,021	2,704
8	2,306	3,355	45	2,014	2,690
9	2,262	3,250	50	2,009	2,678
10	2,228	3,169	60	2,000	2,660
12	2,179	3,055	70	1,994	2,648
14	2,145	2,977	80	1,990	2,639
16	2,120	2,921	90	1,987	2,632
18	2,101	2,878	100	1,984	2,626
20	2,086	2,845	∞	1,960	2,576

Если полученное значение превышает табличное, оно рассматривается как значимое (*p*=0,05), либо как высоко значимое (*p*=0,01).

Процедуры генерирования: для заданного значения *t* при числе степеней свободы df значение p может быть найдено при помощи процедур, описанных в Разделе 8.1, где $F=t^2$, *df1*=1, а *df2=df*.

Для заданного числа степеней свободы df значение t (при p=0.05) может быть найдено с помощью следующей процедуры (точность в этом случае должна быть до 6 десятичного знака):

$$t = 1,959964+ 2,37228/df+ 2,82202/df^2+ 2,56449/df^3+ 1,51956/df^4+ 1,02579/df^5+ 0,44210/df^7$$

8.3. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ c^2

df	p = 0,05	p = 0,01	df	p = 0,05	p = 0,01
1	3,841	6,635	11	19,675	24,725
2	5,991	9,210	12	21,026	26,217
3	7,815	11,345	13	22,362	27,688
4	9,488	13,277	14	23,685	29,141
5	11,070	15,086	15	24,996	30,578
6	12,592	16,812	16	26,296	32,000
7	14,067	18,475	20	31,410	37,566
8	15,507	20,090	25	37,652	44,314
9	16,919	21,666	30	43,773	50,892
10	18,307	23,209	40	55,758	63,691

Если полученное значение превышает табличное, оно рассматривается как значимое (p=0,05), либо как высоко значимое (p=0,01).

Процедура генерирования: Обозначим χ^2 через x2, а *df* присвоим значение, указанное выше. Выполнение следующей процедуры генерирует значение *p*.

```
s=0:  t=exp(-x2/2)          x=sqr(x2) :    s=0

                            t=x*exp(-x2/2)/sqr(pi/2)
for i=2 to df step 2        for i=3 to df step 2
s=s+t                       s=s+t
t=t*x2/i                    t=t*x2/i
next i                      next i

p=1-s                       p=1-s-2*phi(x)
```

В этой процедуре `phi` является функцией кумулятивного стандартного нормального распределения Φ (см. Раздел 8.4).

8.4. Φ-РАСПРЕДЕЛЕНИЕ (КУМУЛЯТИВНАЯ СТАНДАРТНАЯ ФУНКЦИЯ НОРМАЛЬНОГО РАСПРЕДЕЛЕНИЯ)

x	Φ	x	Φ	x	Φ
0,00	0,500	1,00	0,841	2,00	0,977
0,05	0,520	1,05	0,853	2,05	0,980
0,10	0,540	1,10	0,864	2,10	0,982
0,15	0,560	1,15	0,875	2,15	0,984
0,20	0,579	1,20	0,885	2,20	0,986
0,25	0,599	1,25	0,894	2,25	0,988
0,30	0,618	1,30	0,903	2,30	0,989
0,35	0,637	1,35	0,911	2,35	0,991
0,40	0,655	1,40	0,919	2,40	0,992
0,45	0,674	1,45	0,926	2,45	0,993
0,50	0,691	1,50	0,933	2,50	0,994
0,55	0,709	1,55	0,939	2,55	0,995
0,60	0,726	1,60	0,945	2,60	0,995
0,65	0,742	1,65	0,951	2,65	0,996
0,70	0,758	1,70	0,955	2,70	0,997
0,75	0,773	1,75	0,960	2,75	0,997
0,80	0,788	1,80	0,964	2,80	0,997
0,85	0,802	1,85	0,968	2,85	0,998

0,90	0,816	1,90	0,971	2,90	0,998
0,95	0,829	1,95	0,974	2,95	0,998

Для отрицательных *x* Ф-значение находят из таблицы, как 1-Ф(-x).
Процедура генерирования: примем значение *x* равно x. Следующая процедура позволяет получить значения Ф при 0 ≤ x ≤ 8,15. Если *x* больше 8,15, Ф -значение можно принять равным 1. Для отрицательных *x* может быть использована формула, приведенная выше. Данная процедура предполагает, что компьютер может представлять около 15 десятичных знаков. Если число десятичных знаков меньше или больше, в процедуру необходимо внести определенные простые преобразования.

```
s=0 : t=[ : i=1
repeat
s=s+t : i=i+2 : t=t*x*x/i
until t<1E-16
phi=0.5+s*exp(-
[*x/2)/sqr(2*phi)
```

8.5. СЛУЧАЙНЫЕ РАЗМЕЩЕНИЯ

Необходимость в случайных размещениях возникает в случае использования схемы рандомизированных блоков. Приведенный ниже алгоритм позволяет получить случайное размещение N исследований, используя встроенный в компьютер генератор псевдослучайных чисел.

1. записывают N возможных исследований в ряд;
2. генерируют случайное целое число r, чтобы 1 ≤ r ≤ N;
3. Меняют местами r-тое и N-тое исследования;
4. Уменьшают N на единицу (N=N-1) и повторяют шаги 2-4 до тех пор, пока N не станет равно 1.

Например, проиллюстрируем этот алгоритм случаем из 6 исследований

1.	N = 6	S_1	S_2	S_3	T_1	T_2	T_3
2.	r = 2		→				←
3.		S_1	T_3	S_3	T_1	T_2	S_2
4.	N = 5						
2.	r = 4				→	←	
3.		S_1	T_3	S_3	T_2	T_1	S_2
4.	N = 4						
2.	r = 4				↓		
3.		S_1	T_3	S_3	T_2	T_1	S_2
4.	N = 3						
2.	r = 1	→		←			
3.		S_3	T_3	S_1	T_2	T_1	S_2
4.	N = 2						
2.	r = 1	→	←				
3.		T_3	S_3	S_1	T_2	T_1	S_2
4.	N = 1						

8.6. ЛАТИНСКИЕ КВАДРАТЫ

Приведенный ниже пример показывает, как можно построить латинский квадрат, используя три независимых размещения.

1. Генерируют случайное размещение N возможных исследований (см. Раздел 8.5);

T_3	S_3	S_1	T_2	T_1	S_2

2. Используя это размещение, можно построить простой латинский квадрат. Для этого размещение «поворачивают» по часовой стрелке следующим образом. Полученное в ходе выполнения шага 1 размещение записывают в первой строке. Во вторую строку записывают те же значения, но смещенные на один столбец вправо. При этом крайнее правое значение записывают в левую пустую ячейку. Процедуру повторяют до тех пор, пока каждое исследование не встретится по одному разу в каждом столбце:

T_3	S_3	S_1	T_2	T_1	S_2
S_2	T_3	S_3	S_1	T_2	T_1
T_1	S_2	T_3	S_3	S_1	T_2
T_2	T_1	S_2	T_3	S_3	S_1
S_1	T_2	T_1	S_2	T_3	S_3
S_3	S_1	T_2	T_1	S_2	T_3

3. Генерируют два независимых случайных размещения натуральных чисел от 1 до N:
Одно для строк

2	3	6	1	4	5

И одно для столбцов

3	4	6	2	5	1

4. Теперь можно построить латинский квадрат, сортируя строки и столбцы простого латинского квадрата в порядке возрастания для этих двух размещений для строк и столбцов:

	3	4	6	2	5	1
2	T_3	S_3	S_1	T_2	T_1	S_2
3	S_2	T_3	S_3	S_1	T_2	T_1
6	T_1	S_2	T_3	S_3	S_1	T_2
1	T_2	T_1	S_2	T_3	S_3	S_1
4	S_1	T_2	T_1	S_2	T_3	S_3
5	S_3	S_1	T_2	T_1	S_2	T_3

↓

	1	2	3	4	5	6
1	S_1	T_3	T_2	T_1	S_3	S_2
2	S_2	T_2	T_3	S_3	T_1	S_1
3	T_1	S_1	S_2	T_3	T_2	S_3

4	S_3	S_2	S_1	T_2	T_3	T_1
5	T_3	T_1	S_3	S_1	S_2	T_2
6	T_2	S_3	T_1	S_2	S_1	T_3

9. ПРИНЯТЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ

Символ	*Определение*
a	Точка пересечения с осью ординат линейной регрессии зависимости полученных результатов от дозы или натурального логарифма дозы
b	Угловой коэффициент линейной регрессии зависимости полученных результатов от дозы или натурального логарифма дозы
d	Число уровней дозы для каждого из препаратов (кроме плацебо препарата для модели угловых коэффициентов)
e	Основание натурального логарифма (= 2,71828182845905...)
g	Статистика, применяемая в теореме Филлера (Fieller's): $g = \frac{C-1}{C}$
h	Число препаратов, используемых при количественном определении, включая стандартный препарат
m	Оценка активности, рассчитанная как отношение эффектов в общей линейной модели
n	Число повторений для каждого испытания
p	Вероятность того, что данная статистика будет больше полученного значения. Используется также для обозначения отношения r/n в пробит методе
r	Число единиц в группе, которые дали позитивный эффект в ходе количественного определения с альтернативными эффектами
s	Оценка стандартного отклонения ($=\sqrt{s^2}$)
s^2	Оценка дисперсии неисключенной (остаточной) вариации. При дисперсионном анализе рассчитывается как средний квадрат погрешности
t	Критерий Стьюдента (Таблица 8.2)
v_{11}, v_{12}, v_{22}	(ко)вариационные множители для числителя и знаменателя отношения *m* в теореме Филлера
w	Весовой коэффициент
x	Натуральный логарифм дозы
y	Полученный результат или преобразованный результат
A	Предполагаемые активности испытуемых препаратов на стадии подбора доз
B	Средний результат плацебо испытаний для модели угловых коэффициентов
C	Статистика, используемая при расчете доверительных интервалов: $C = \frac{1}{1-g}$
$C_1, \ldots, C_n$	Среднее значение для каждого столбца латинского квадрата
D	Доза стандартного или испытуемого препарата
D_1, D_2	Среднее значение для Периода 1 и Периода 2 для двойной перекрестной схемы
F	Отношение двух независимых значений дисперсии при *F*-распределении (Таблица 8.1)
G_S, G_T,...	Усредненные значения, используемые при дисперсионном анализе для модели угловых коэффициентов

H_P, H_L	Множители, используемые при дисперсионном анализе для модели параллельных линий
H_B, H_I	Множители, используемые при дисперсионном анализе для модели угловых коэффициентов
I	Натуральный логарифм отношения между соседними дозами, для модели параллельных линий или интервал между соседними дозами, для модели угловых коэффициентов
J_S, J_T,...	Характеристики линейности, используемые при дисперсионном анализе для модели угловых коэффициентов
K	Поправочный коэффициент, используемый для расчета сумм квадратов отклонений при дисперсионном анализе
L	Ширина доверительного интервала, выраженная в логарифмах
L_S, L_T,...	Линейные контрасты стандартного и испытуемого препаратов
M'	Натуральный логарифм отношения активностей для данного испытуемого препарата
N	Суммарное число испытаний в ходе количественного определения (=*dh*)
P_S, P_T,...	Сумма стандартного (*S*) и испытуемого (*T*)препаратов
R	Оцененная активность данного испытуемого препарата
R'	Отношение активностей данного испытуемого препарата
R_1,..., R_n	Среднее значение данных в каждой строке от 1 до *n* для схемы латинского квадрата или в каждом боке, для схемы рандомизированных блоков
S	Стандартный препарат
S_1,... , S_d	Среднее значение дозы (от минимальной дозы 1 до максимальной дозы *d*) стандартного препарата *S*
SS	Сумма квадратов, обусловленная данным источником вариации
T, U, V, ...	Испытуемые препараты
T_1 ,... , T_d	Среднее значение дозы (от минимальной дозы 1 до максимальной дозы *d*) испытуемого препарата *T*
V	Коэффициент вариации, используемый при расчете границ доверительного интервала
W	Весовой коэффициент, применяемый при объединении результатов количественного определения
X	Линейная структура или матрица планирования, используемые в общих линейных моделях
Y	Вектор, представляющий данные (преобразованные) в общих линейных моделях
Z	Первая производная от *Φ*
p	3.141592653589793238...
Φ	Функция кумулятивного стандартного нормального распределения характеристической кривой (Таблица 8.4)
c2	Критерий хи-квадрат (Таблица 8.3.)

5.3.2 СТАТИСТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ХИМИЧЕСКОГО ЭКСПЕРИМЕНТА

ПРИНЯТЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ

В настоящей статье приняты следующие обозначения:

A	измеряемая величина
a	свободный член линейной зависимости
b	угловой коэффициент линейной зависимости
F	критерий Фишера
$f(x, \mu, s)$	функция плотности вероятности нормального распределения
H_0	нулевая гипотеза
H_1	альтернативная гипотеза
I	порядковый номер варианты
L	фактор, используемый при оценке сходимости результатов параллельных определений
T, n	объемы выборки
P	доверительная вероятность без конкретизации постановки задачи
P_2, P_1	доверительная вероятность соответственно при двух- и односторонней постановке задачи
Q_1, Q_n	контрольные критерии для идентификации грубых погрешностей
R	размах варьирования
R_c	общий индекс корреляции
r	(линейный) коэффициент корреляции
$RSD = s_r \times 100\%$	относительное стандартное отклонение, в процентах
$RSD_{\bar{x}} = s_{\bar{x},r} \times 100\%$	относительное стандартное отклонение среднего значения, в процентах
s	стандартное отклонение
s_r	относительное (по отношению к среднему результату) стандартное отклонение
s^2	дисперсия
s_r^2	относительная дисперсия
$s_{\bar{x}}$	стандартное отклонение среднего результата
$s_{\bar{x},r}$	относительное (по отношению к среднему результату) стандартное отклонение среднего результата
$s_{\lg}$	логарифмическое стандартное отклонение
$s_{\ln}^2$	логарифмическая дисперсия
$s_{\lg \bar{x}}$	логарифмическое стандартное отклонение среднего результата
s_0^2, s_b^2, s_a^2	общая дисперсия и дисперсия коэффициентов линейной за-

	висимости
t	критерий Стьюдента
U	коэффициент для расчета границ среднего результата гарантии качества анализируемого продукта
x, y	текущие координаты в уравнении линейной зависимости
X_i, Y_i	вычисленные, исходя из уравнения линейной зависимости, значения переменных *x* и *y;*
$\bar{x}, \bar{y}$	средние значения выборки (координаты центра линейной зависимости);
x_i, y_i	*i*-тая варианта (*i*-тая пара экспериментальных значений *x* и у);
$\bar{x} \pm D_{\bar{x}}$	граничные значения доверительного интервала среднего результата
$x_i \pm D_x$	граничные значения доверительного интервала результата единичного определения;
Δ	разность некоторых величин;
α	уровень значимости, степень надежности; погрешность первого рода (вероятность принятия гипотезы H_1 , в то время как на самом деле верна гипотеза H_0);
β	погрешность второго рода (вероятность принятия гипотезы H_0 , в то время как на самом деле верна гипотеза H_1);
γ	критическая статистика;
D_x	полуширина доверительного интервала неопределенности единичного определения;
$D_{\bar{x}}$	полуширина доверительного интервала неопределенности среднего результата;
$D_{x,r}$	полуширина относительного доверительного интервала неопределенности единичного определения
$D_{\bar{x},r}$	полуширина относительного доверительного интервала неопределенности среднего результата;
$\Delta_{As,r}$	суммарная неопределенность анализа
$\Delta_{FAO,r}$	неопределенность конечной аналитической операции
$\Delta_{RS,r}$	неопределенность аттестации стандартного образца;
$\Delta_{SP,r}$	неопределенность пробоподготовки
δ	относительная величина систематической погрешности;
$e, \bar{e}$	относительные неопределенности, соответственно, результата отдельного определения и среднего результата;
μ	истинное значение измеряемой величины
ν	число степеней свободы; переменный объем выборки при последовательном анализе;
n_{eff}	«эффективное» число степеней свободы в подходе Уэлча-Сатертуэйта
Σ	знак суммирования (сумма)
s^2	дисперсия генеральной совокупности
c^2	критерий хи-квадрат

Метрологические характеристики методик и результатов, получаемых при статистической обработке данных эксперимента, позволяют проводить оценку и сравнение как экспериментальных методик, так и изучаемых объектов и на этой основе решать ряд прикладных задач, связанных с определением статистической достоверности результатов исследования. В частности, описанные ниже статистические подходы и метрологические характеристики используются при валидации разрабатываемых методик и оценке корректности полученных результатов анализа.

В главах 1-9 описаны подходы, применяемые при статистическом анализе результатов, являющихся функцией одной случайной переменной. Применение этих подходов для функции нескольких случайных переменных описано в главе 10. В главе 11 приведены необходимые статистические таблицы.

При изложении материала используются термины, принятые в общей статье «Валидация аналитических методик и испытаний».

1. ВЫБОРКА

Термином «выборка» обозначают совокупность статистически эквивалентных результатов (вариант). В качестве такой совокупности можно, например, рассматривать ряд результатов, полученных при параллельных определениях содержания какого-либо вещества в однородной по составу пробе. Отдельные значения вариант выборки объема n принято обозначать через x_i, $(1 \le i \le n)$. Упорядоченная в порядке возрастания выборка может быть представлена в виде:

$$x_1; x_2; ...x_i; ...x_{n-1}; x_n . \qquad (1.1)$$

Результаты, полученные при статистической обработке выборки, будут достоверны лишь в том случае, если эта выборка однородна. Проверка однородности выборки обсуждается в разделе 1.2. Однако, если целью испытаний является проверка однородности серии препарата (например, при проведении испытания «Однородность содержания действующего вещества в единице дозированного лекарственного средства»), то оцениваются все полученные результаты (значения вариант) без предварительной проверки однородности выборки.

1.1. СРЕДНЕЕ ЗНАЧЕНИЕ И ДИСПЕРСИЯ

В большинстве случаев среднее выборки $\bar{x}$ является наилучшей оценкой истинного значения измеряемой величины m, если его вычисляют как среднее арифметическое всех вариант:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{1}^{n} x_i}{n} \qquad (1.2)$$

При этом разброс вариант x_i вокруг среднего $\bar{x}$ характеризуется величиной стандартного отклонения s. В количественном химическом анализе величина s часто рассматривается как мера случайной погрешности, свойственной данной методике анализа. Квадрат этой величины s^2 называют дисперсией. Величина дисперсии может рассматриваться как мера воспроизводимости (сходимости) результатов, представленных в данной выборке. Вычисление величин s^2 и s проводят по уравнениям 1.5 и 1.6. Иногда для этого предварительно определяют значения отклонений d_i и число степеней свободы (число независимых вариант) n:

$$d_i = x_i - \bar{x} \qquad (1.3)$$

$$n = n - 1 \qquad (1.4)$$

$$s^2 = \frac{\sum_1^n d_i^2}{n} = \frac{\sum_1^n x_i^2 - n\bar{x}^2}{n} \qquad (1.5)$$

$$s = \sqrt{s^2} \qquad (1.6)$$

Стандартное отклонение среднего результата $s_{\bar{x}}$ рассчитывают по уравнению:

$$s_{\bar{x}} = \frac{s}{\sqrt{n}} \qquad (1.7)$$

Во многих случаях при контроле качества лекарственных средств целесообразно использовать относительные (по отношению к $\bar{x}$) величины – относительное стандартное отклонение s_r, относительную дисперсию s_r^2 и относительное стандартное отклонение среднего результата $s_{\bar{x},r}$. Их рассчитывают по соотношениям:

$$s_r^2 = \frac{s^2}{\bar{x}^2} \qquad (1.5a)$$

$$s_r = \frac{s}{\bar{x}} \qquad (1.6a)$$

$$s_{\bar{x},r} = \frac{s_r}{\sqrt{n}} \qquad (1.7a)$$

Эти относительные величины, в зависимости от решаемой задачи, могут выражаться также и в % к $\bar{x}$. В этом случае они часто обозначаются, соответственно, как *RSD* и $RSD_{\bar{x}}$:

$$RSD = s_r \times 100\% \qquad (1.6b)$$

$$RSD_{\bar{x}} = s_{\bar{x},r} \times 100\% \qquad (1.7b)$$

В фармакопейном анализе абсолютные величины обычно используют для прямых, а относительные - для косвенных методов анализа.

Пример расчетов приведен в Разделе 9.1.

Если при измерениях получают логарифмы искомых вариант, среднее выборки вычисляют как среднее геометрическое, используя логарифм вариант:

$$lg\,\bar{x}_g = \frac{\sum_1^n lg\,x_i}{n}, \qquad (1.8)$$

откуда

$$\bar{x}_g = \sqrt[n]{x_1 \times x_2 \times ... \times x_n} = anti\,lg(lg\,\bar{x}_g)\,. \qquad (1.9)$$

Значения s^2, s и $s_{\bar{x}}$ в этом случае также рассчитывают, исходя из логарифмов вариант, и обозначают соответственно через s^2_{lg}, s_{lg} и $s_{lg\,\bar{x}}$.

1.2. ПРОВЕРКА ОДНОРОДНОСТИ ВЫБОРКИ. ИСКЛЮЧЕНИЕ ВЫПАДАЮЩИХ ЗНАЧЕНИЙ ВАРИАНТ.

Как было указано выше, значения x, s^2, s и $s_{\bar{x}}$ могут быть признаны достоверными, если ни одна из вариант выборки не отягощена грубой погрешностью, т. е. если выборка однородна. Выявление грубых погрешностей (выбросов) – это весьма деликатная задача, относительно которой в литературе нет единого устоявшегося мнения (смотрите, например, раздел 7.3. статьи "5.3. *Статистический анализ результатов биологических тестов и количественных определений*"). Особенно это относится к выборкам совсем малого объема (3-5 измерений). Проверку таких выборок на однородность целесообразно проводить только в том случае, если методика метрологически аттестована (см. раздел 6.1). Ниже приводятся наиболее часто используемые подходы для проверки однородности выборок малого (n £ 10) и большого ($n > 10$) объема.

Проверка однородности выборок малого объема ($n \leq 10$) осуществляется без предварительного вычисления статистических характеристик. С этой целью после представления выборки в виде (1.1) для крайних вариант x_1 и x_n (которые предполагаются выпадающими) рассчитывают значения контрольного критерия Q, исходя из величины размаха варьирования R:

$$R = \begin{cases} |x_1 - x_n| & для \quad n = 3...7 \\ |x_1 - x_{n-1}| & для \quad n = 8...10 \end{cases} \qquad (1.10)$$

$$Q_1 = \frac{|x_1 - x_2|}{R} \qquad (1.11a)$$

$$Q_n = \frac{|x_n - x_{n-1}|}{R} \qquad (1.11b)$$

Выборка признается неоднородной, если хотя бы одно из вычисленных значений Q_1 или Q_n превышает табличное значение $Q(P_1,n)$, найденное для доверительной вероятности P_1 (см. Таблицу 11.1 Приложения). Варианты x_1 или x_n, для которых соответствующее значение $Q > Q(P_1,n)$, отбрасываются, и для полученной выборки уменьшенного объема выполняют новый цикл вычислений по уравнениям 1.10 и 1.11 с целью проверки ее однородности.

При $|x_1 - x_2| < |x_2 - x_3|$ и $|x_n - x_{n-1}| < |x_{n-1} - x_{n-2}|$ уравнения 1.11а и 1.11б принимают вид:

$$Q_1 = \frac{|x_2 - x_3|}{R}; \qquad Q_n = \frac{x_{n-1} - x_{n-2}}{R} \qquad (1.12)$$

Полученная в конечном счете однородная выборка используется для вычисления x, s^2, s и $s_{\bar{x}}$.

Для выборок большого объема ($n > 10$) проверку однородности проводят после предварительного вычисления статистических характеристик x, s^2, s и $s_{\bar{x}}$. При этом

выборка признается однородной, если для всех вариант (1.3) выполняется условие:

$$|d_i| > 3s \quad (1.13)$$

Если выборка признана неоднородной, то варианты, для которых $|d_i| > 3s$, отбрасываются, как отягощенные грубыми погрешностями с доверительной вероятностью P_2 > 99,0%. В этом случае для полученной выборки сокращенного объема повторяют цикл вычислений статистических характеристик по уравнениям 1.2-1.7 и снова проводят проверку однородности. Вычисление статистических характеристик считают законченным, когда выборка сокращенного объема оказывается однородной.

1.3. Доверительные интервалы и оценка их величины.

Если случайная однородная выборка конечного объема *n* получена в результате последовательных измерений некоторой величины *A*, имеющей истинное значение *m*, то среднее этой выборки $\bar{x}$ следует рассматривать лишь как приближенную оценку *A*. Достоверность этой оценки характеризуется величиной доверительного интервала $\bar{x} \pm D_{\bar{x}}$, для которой с заданной доверительной вероятностью *P* выполняется условие:

$$\left(\bar{x} - \Delta_{\bar{x}}\right) \le m \le \left(\bar{x} + \Delta_{\bar{x}}\right) \qquad (1.14)$$

Следует отметить, что данный доверительный интервал не характеризует (как это нередко считается) погрешность определения величины *m*, поскольку найденная величина $\bar{x}$ может быть в действительности очень близка к истинному значению *m*. Но мы этого истинного значения не знаем. Полученный доверительный интервал характеризуют степень неопределенности наших знаний об истинном значении *m* величины *A* по результатам последовательных измерений выборки конечного объема *n*. Поэтому правильно говорить (и далее это будет использоваться) о «*неопределенности* результатов анализа» (которая характеризуется доверительным интервалом) вместо выражения «*погрешность* результатов анализа», которое нередко не совсем корректно используется.

Расчет граничных значений доверительного интервала при известном значении стандартного отклонения *s* или для выборок большого объема проводят по уравнению

$$\left(\bar{x} \pm D_{\bar{x}}\right) = x \pm \frac{U(P) \times s}{\sqrt{n}} \qquad (1.15)$$

предполагая, что варианты, входящие в выборку, распределены нормально. Здесь *U(P)* – табличное значение функции нормального распределения.

Для выборок небольшого объема граничные значения доверительного интервала рассчитывают с использованием критерия Стьюдента:

$$\left(\bar{x} \pm D_{\bar{x}}\right) = x \pm \frac{t(P,n) \times s}{\sqrt{n}} \qquad (1.16)$$

или, с использованием относительных величин:

$$\left(1 \pm \frac{D_{\bar{x}}}{\bar{x}}\right) = \left(1 \pm D_{\bar{x},r}\right) = 1 \pm \frac{t(P,n) \times s_r}{\sqrt{n}} \qquad (1.16a)$$

где:

$t(P,n)$ - табличное значение критерия Стьюдента (см. Таблицу 11.2). Распределение Стьюдента $t(P,n)$ является обобщением нормального распределения $U(P)$ и переходит в него при достаточно большом числе степеней свободы n , т.е. $t(P,n)$ **à** $U(P)$. С учетом этого для единообразия далее везде будет использоваться более часто употребляемое соотношения (1.16) и (1.16а), даже если речь идет об обработке выборок достаточно большого объема.

Полуширины относительных доверительных интервалов единичного ($D_{x,r}$) и среднего ($D_{\bar{x},r}$) результатов часто выражают в процентах к $\bar{x}$. В этом случае в выражении (1.16а) вместо величины s_r используют RSD , а вместо 1 берут 100%, т.е.:

$$\left(100 + D_{\bar{x},r}\,\%\right) = 100 \pm \frac{t(P,n)\times RSD}{\sqrt{n}} \qquad (1.16b)$$

Если при измерении одной и той же методикой двух близких значений A были получены две случайные однородные выборки с объемами n и m, то при $m < n$ для выборки объема m справедливо выражение:

$$\bar{x}_{(m)} \pm D_{\bar{x}(m)} = \bar{x}_{(m)} \pm \frac{t(P,n_{(n)})\times S_{(n)}}{\sqrt{m}} \qquad (1.17)$$

(индекс указывает принадлежность величин к выборке объема m или n).

Выражение 1.17 позволяет оценить величину доверительного интервала среднего $\bar{x}_{(m)}$, найденного, исходя из выборки объема m. Иными словами, доверительный интервал среднего $\bar{x}_{(m)}$ выборки относительно малого объема m может быть сужен благодаря использованию известных величин $s_{(n)}$ и $t(P,\ n_{(n)})$, найденных ранее для выборки большего объема n. Более общим подходом является объединение выборок с расчетом объединенного стандартного отклонения и степеней свободы по уравнениям (2.1-2.2). Это стандартное отклонение и соответствующий объединенному числу степеней свободы критерий Стьюдента подставляются затем в выражение (1.17).

Аналогично (1.14-.1.16) определяется доверительный интервал результата отдельного определения. Подставляя $n = 1$ в выражение 1.16, получаем:

$$x_i \pm D_x = x_i \pm t(P,n)\times s \qquad (1.18)$$

или, с использованием относительных величин:

$$\frac{x_i}{\bar{x}} \pm Dx,r = \frac{x_i}{\bar{x}} \pm t(P,n)\times s_r \qquad (1.18a)$$

Этот интервал является доверительным интервалом результата отдельного определения. Для него с доверительной вероятностью P выполняются взаимосвязанные условия:

$$x_i - D_x \le m \le x_i + D_x \qquad (1.19)$$

$$m - D_x \le x_i \le m + D_x \qquad (1.20)$$

Значения $D_{\bar{x}}$ и D_x из выражений (1.16) и (1.18) используют при вычислении относительных неопределенностей отдельной варианты (e) и среднего результата ($\bar{e}$), выражая эти величины в процентах:

$$e = D_{x,r} \times 100\% = \frac{D_x}{\bar{x}} \times 100\% \qquad (1.21)$$

$$\bar{e} = D_{\bar{x},r} \times 100\% = \frac{D_{\bar{x}}}{\bar{x}} \times 100\% \qquad (1.21a)$$

Если при измерениях получают логарифмы исходных вариант, выражения (1.16) и (1.18) принимают вид:

$$lg\,\bar{x} \pm D_{lg\,\bar{x}} = lg\,\bar{x} \pm \frac{t(P,n) \times s_{lg}}{\sqrt{n}} \qquad (1.22)$$

$$lg\,x_i \pm D_{lg\,x} = lg\,x_i \pm t(P,n) \times s_{lg} \qquad (1.23)$$

Потенцирование выражений (1.22) и (1.23) приводит к несимметричным доверительным интервалам для значений $\bar{x}$ и x_i,:

$$anti\,lg(lg\,\bar{x} - D_{lg\,\bar{x}}) \le \bar{x} \le anti\,lg(lg\,\bar{x} + D_{lg\,\bar{x}}) \qquad (1.24)$$

$$anti\,lg(lg\,x_i - D_{lg\,x}) \le x_i \le anti\,lg(lg\,x_i + D_{lg\,x}) \qquad (1.25)$$

где:

$$D_{lg\,\bar{x}} = \frac{t(P,n) \times s_{lg}}{\sqrt{n}} \qquad (1.26)$$

$$D_{lg\,x} = t(P,n) \times s_{lg} \qquad (1.27)$$

При этом для нижних и верхних границ доверительных интервалов $\bar{x}$ и x_i имеем:

$$\bar{e} = \left[\frac{\left| anti\,lg(lg\,\bar{x} \pm D_{lg\,\bar{x}}) - \bar{x} \right|}{\bar{x}} \right] \times 100\% \qquad (1.28a)$$

$$e = \left[\frac{\left| anti\,lg(lg\,x_i \pm D_{lg\,x}) - x_i \right|}{x_i} \right] \times 100\% \qquad (1.28b)$$

1.4. Односторонние и двусторонние доверительные интервалы.

Соотношение (1.14-1.28) характеризуют так называемые «двусторонние» доверительные интервалы. Они основаны на двустороннем t–распределении и широко применяются при оценке точности методик и представлении результатов. Однако при решении вопросов гарантии качества продукции **(см. Раздел 6)**, а также при контроле серийной продукции, в частности, при контроле качества лекарственных средств, нередко возникает необходимость использования так называемых «односторонних» до-

верительных интервалов. Например, для какого-нибудь готового лекарственного средства допуски содержания активного компонента установлены 90-110% от номинального. В процессе анализа получено среднее значение содержания $\bar{x}$ = 94% от номинального значения. Нас интересует, не выходит ли доверительный интервал за допуски содержания (90-110 %). Очевидно, что в данном случае этот доверительный интервал может выйти за пределы только нижнего допуска (90%), но не нижнего и верхнего (110%) одновременно. Вопрос о возможности выхода истинной величины m за пределы верхнего допуска нас в данном случае не интересует (в связи с его крайне низкой вероятностью). Таким образом, истинное значение m находится в интервале

$$\bar{x} - D_{\bar{x}} \le m \le \infty \qquad (1.29a)$$

Аналогичное выражение можно записать для случая, когда $\bar{x}$ превышает 100 % (например, $\bar{x}$ = 105 %):

$$-\infty \le m \le \bar{x} + D_{\bar{x}} \qquad (1.29b)$$

Соотношения (1.29a-1.29b) характеризуют односторонние доверительные интервалы, поскольку величина m ими ограничивается только с одной стороны. Это отличает их от соотношения (1.14) , где величина m ограничивается с обеих сторон. Табличные значения критерия Стьюдента для одностороннего и двухстороннего распределения приведены в Табл. 11.2. Существует следующее соотношение между двухсторонним (P_2) и односторонним (P_1) критериями Стьюдента:

$$t[P_2, n] = t[(2P_1 - 1), n] \qquad (1.30)$$

В частности, односторонний критерий Стьюдента для вероятности 0,95 (т.е. 95%) совпадает с двухсторонним критерием Стьюдента для вероятности 0,90 (т.е. 90%).

Таким образом, P_2 – это вероятность того, что математическое ожидание (или истинное значение) оцениваемой величины находится в двусторонне ограниченных пределах (1.14-1.28), а P_1 – это вероятность того, что оно находится в односторонне ограниченных пределах (1.29-1.30). В литературе (в частности, в таблицах) нередко используются обозначаемые по-разному величины $(1\text{-}P_2)$ и $(1\text{-}P_1)$, которые характеризуют вероятность того, что математическое ожидание (или истинное значение) оцениваемой величины *выходит* за вышеуказанные пределы. Во многих случаях такие величины являются более удобными.

2. Метрологические характеристики методики анализа

Метрологические характеристики методики устанавливают путем статистической обработки одной выборки или совместной статистической обработки нескольких выборок из одной и той же генеральной совокупности. В качестве таких выборок могут использоваться как данные аналитического архива лаборатории, так и результаты, полученные специально при анализе образцов с известным содержанием определяемого компонента μ. Результаты статистической обработки могут быть представлены в виде Табл. 2.1.

Таблица 2.1

Метрологические характеристики методики анализа

μ	ν	$\bar{x}$	s	P	$t(P,\nu)$	Δ_x	ε
1	2	3	4	5	6	7	8

Во многих случаях проще использовать относительные (по отношению к m) величины. Результаты статистической обработки могут быть представлены в этом случае в виде Табл. 2.1а.

Таблица 2.1а

Метрологические характеристики методики анализа

m	n	$\bar{x}/m$	s	s_r	P	$t(P,n)$	$D_{x,r}$	e
1	2	3	4	5	6	7	8	9

2.1. Объединение выборок.

2.1.1. Объединенная дисперсия и объединенное среднее

Если имеется g выборок из одной генеральной совокупности с порядковыми номерами k $(1 \le k £ g)$, расчет дисперсии s^2 целесообразно проводить по формуле:

$$s^2 = \frac{\sum_{k=1}^{k=g}\sum_{i=1}^{i=n_k} d_{ik}^2}{n_t} = \frac{\sum_{k=1}^{k=g}\left[(n_k - 1)s_k^2\right]}{n_t} = \frac{\sum_{k=1}^{k=g}\left(\sum_{i=1}^{i=n_k} x_{ik}^2 - n_k \bar{x}_k^2\right)}{n_t} \qquad (2.1)$$

или для относительных величин, принимая во внимание, что $n_k - 1 = n_k$:

$$s_r^2 = \frac{\sum_{k=1}^{k=g} n_k \times s_{k,r}^2}{n_t} \qquad (2.1a)$$

$$RSD_{tot}^2 = \frac{\sum_{k=1}^{k=g} n_k \times RSD_k^2}{n_t} \qquad (2.1b)$$

При этом объединенное число степеней свободы n_t равно

$$n_t = \sum_{k=1}^{g} n_k \qquad (2.2)$$

где

$\bar{x}_k$ - среднее k-той выборки;

n_k - число вариант в k-той выборке;

n_t - число степеней свободы в *k*-той выборке;
x_{ik} - *i*-тая варианта *k*-той выборки;
s_k^2 - дисперсия *k*-той выборки;
$s_{k,r}^2$ - относительная дисперсия *k*-той выборки;
d_{ik} - отклонение *i*-той варианты *k*-той выборки.

Если *g* выборок из одной генеральной совокупности с порядковыми номерами *k* (1≤*k£g)* характеризуются выборочными средними значениями $\bar{X}_k$, полученными из n_k вариант, то объединенное среднее значение $\bar{X}$ по всем выборкам рассчитывают по формуле:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{k=1}^{k=g} n_k \times \bar{x}_k}{\sum_{k=1}^{k=g} n_k} \qquad (2.3)$$

Необходимым условием совместной статистической обработки нескольких выборок является отсутствие статистически значимой разницы между отдельными значениями s_k^2 (т.е. справедливость гипотезы равенства дисперсий). В простейшем случае можно ограничиться сравнением крайних значений s_k^2 с использованием критерия Фишера *F*, как указано в разделе 3. В более общем случае используют критерии Бартлетта и Кохрейна.

2.1.2. Критерий Бартлетта.

Для проверки гипотезы, что все s_k^2 принадлежат одной генеральной совокупности, используют выражение, приближенно распределенное как c^2:

$$c^2 = 2{,}303 \times \left(n_t \times lg\, s^2 - \sum_{k=1}^{g} n_k \times lg\, s_k^2 \right) \qquad (2.4)$$

При этом величины *s* и n_t рассчитываются по уравнениям (2.1) и (2.2). Найденная таким образом величина c^2 сравнивается с процентной точкой хи-квадрат распределения $c^2(P_1,n_c)$ (см. Таблица 11.3 Приложения). Если имеется *g* выборок, то число степеней свободы для $c^2(P_1,n_c)$ берется равным n_c=*g*-1. Проверяемая гипотеза принимается при условии $c^2 < c^2(P_1,n_c)$. В противном случае вычисленное значение c^2 корректируют по формуле

$$c^{*2} = \frac{c^2}{C} \qquad (2.5)$$

где $C = \frac{\left[\sum_{k=1}^{g} (1/n_k) \right] - 1/n_t}{3(g-1)} + 1$

и снова сравнивают с процентной точкой хи-квадрат распределения $c^2(P_1,n_c)$. Если $c^{*2} > c^2(P_1,n_c)$, то между некоторыми стандартными отклонениями имеются значимые различия. В этом случае необходимо провести анализ имеющихся данных, отбросить одно или несколько значений дисперсии, наиболее сильно отличающиеся от остальных, и

снова провести тест Бартлетта. Нужно иметь в виду, что критерий Бартлетта (также как и критерий Кохрейна) очень чувствителен к нарушению требования нормальности. Но именно поэтому он может быть весьма полезен при формировании надежных аналитических архивов.

Описанный критерий Бартлетта применим только при условии, что число степеней свободы у всех объединяемых дисперсий больше 3 (т.е. все $n_k > 3$). Однако именно этот случай нередко и представляет наибольший интерес. Поэтому Бартлеттом была предложена более сложная модификация данного критерия, применимая при любых степенях свободы[9]. Однако использование ее на практике достаточно затруднительно без применения ЭВМ.

2.1.3. Критерий Кохрейна.

В том случае, когда все объединяемые дисперсии имеют одинаковое число степеней свободы (т.е. $n_1 = n_2 = \ldots = n_g = n$) для проверки гипотезы равенства дисперсий можно применять значительно более простой критерий Кохрейна со статистикой:

$$G = \frac{s_{max}^2}{\sum_{k=1}^{g} s_k^2} \qquad (2.6)$$

$$s_{max}^2 = max(s_k^2)\ .$$

Критические точки критерия Кохрейна приведены в Таблице 11.4 Приложения. Рассчитанное значение G на выбранном уровне значимости (95% или 99%) не должно превосходить табличное значение. В противном случае гипотеза равенства дисперсий не может быть принята и формулы (2.1-2.2) объединения выборок не являются корректными.

В формулах (2.4) и (2.6) вместо абсолютных величин s_k^2 могут использоваться относительные величины $s_{r,k}^2$ и RSD_k .

2.2. Проверка наличия значимой систематической погрешности.

При известном содержании определяемого компонента m в образце следует решить вопрос о наличии статистически значимой систематической погрешности. Для этого вычисляют критерий Стьюдента t:

$$t = \frac{|m - \bar{x}| \times \sqrt{m}}{s} \qquad (2.7)$$

или в относительных величинах:

$$t = \frac{\left|1 - \frac{\bar{x}}{m}\right| \times \sqrt{m}}{s_r} \qquad (2.7a)$$

Если, например, при P = 95% и $n = m - 1$, реализуется неравенство

$$t > t(P,n) \qquad (2.8)$$

то полученные данною методикою результаты отягощены систематической погрешностью, относительная величина которой d может быть оценена по формуле:

$$d = \left|1 - \frac{\overline{x}}{m}\right| \times 100\% \qquad (2.9)$$

Значимые систематические погрешности (т.е. погрешности, для которых реализуется неравенство 2.8) должны быть обязательно исключены из результатов анализа.

3. СРАВНЕНИЕ ДВУХ МЕТОДИК АНАЛИЗА ПО ВОСПРОИЗВОДИМОСТИ

Данное сравнение проводят путем выяснения значимости различия выборочных дисперсий анализа этих двух методик. В более общем случае, данный подход применяется для оценки значимости различия двух выборочных дисперсий, например, с целью выяснения, можно ли их считать выборочными оценками одной и той же дисперсии генеральной совокупности.

При сравнении воспроизводимости (сходимости) двух методик анализа с оценками дисперсий s_1^2 и s_2^2 ($s_1^2 > s_2^2$) вычисляют критерий Фишера *F:*

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} \qquad (3.1)$$

Критерий *F* характеризует при $s_1^2 > s_2^2$ достоверность различия между s_1^2 и s_2^2.

Вычисленное значение *F* сравнивают с табличным значением $F(P_1, n_1, n_2)$, найденным при P_1= 99% (см. таблицу 11.5 Приложения).

Если

$$F > F(P_1, n_1, n_2) \qquad (3.2)$$

то различие дисперсий s_1^2 и s_2^2 признается статистически значимым с вероятностью P_1, что позволяет сделать заключение о более высокой воспроизводимости второй методики. При

$$F \le F(P_1, n_1, n_2) \qquad (3.3)$$

различие значений s_1^2 и s_2^2 не может быть признано значимым, и заключение о различии воспроизводимости (сходимости) методик сделать нельзя ввиду недостаточного объема информации. Если

$$F(P_1 = 0{,}95, n_1, n_2) < F < F(P_1 = 0{,}99, n_1, n_2) \qquad (3.4)$$

целесообразно провести дальнейшие экспериментальные исследования для методики с лучшей воспроизводимостью.

При сравнении двух методик анализа результаты статистической обработки могут быть представлены в виде Табл. 3.1. Сравнение желательно проводить при $m_1 = m_2$, $n_1 > 10$ и $n_2 > 10$. Если точные значения m_1 и m_2 неизвестны, величины d и $t_{выч}$ не определяют.

Таблица 3.1

Данные для сравнительной метрологической оценки двух методик анализа

Методика № п/п	m	n	$\overline{x}$	s	P	$t(P,n)$	D_x	e	$t_{выч}$	$F(P, n_1, n_2)$ (табл.) P=99%	$F_{выч}$	d	Примечания
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1 2													

Если при измерениях получают логарифмы исходных вариант, вместо величин μ, $\bar{x}$ и s в таблице 3.1 приводят величины $lg\mu$, $lg\,\bar{x}_g$ и s_{lg}. При этом в графу 8 вносят величину Δ_{lgx}, а в графу 9 – максимальное по абсолютной величине значение ε. Аналогичные замены проводят при вычислении t по уравнению (2.7) и F по уравнению (3.1).

4. МЕТРОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СРЕДНЕГО РЕЗУЛЬТАТА.

Если с помощью данной методики анализа (измерения) следует определить значение некоторой величины A, то для полученной экспериментально однородной выборки объема m рассчитывают величины, необходимые для заполнения табл. 4.1. Если методика имеет метрологическую аттестацию, графы 2, 4, 5, 7, 8 и 9 табл. 4.1 заполняются на основании данных табл. 2.1. Это позволяет значительно сузить границы доверительного интервала за счет большего числа степеней свободы (см. уравнение 1.17). Если $n \le 15$, а $\frac{m+n}{n} > 1{,}5$, величины s и n целесообразно вычислять по формулам (2.1) и (2.2).

Таблица 4.1

Метрологические характеристики среднего результата

m	n	$\bar{x}$	s	$s_{\bar{x}}$	P	$t(P,n)$	Δx	$\Delta\bar{x}$ или $\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$	$\bar{\varepsilon}$
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

Во многих случаях проще использовать относительные (по отношению к $\bar{x}$) величины. В этом случае целесообразно проводить расчеты по Табл. 4.1а.

Таблица 4.1а

Метрологические характеристики среднего результата

m	n	$\bar{x}$	s	s_r	$s_{\bar{x},r}$	P	$t(P,n)$	$\Delta_{\bar{x},r}$	$\bar{\varepsilon}$
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

Таким образом, на основании выражения (1.14) для измеряемой величины A при незначимости систематической погрешности с вероятностью P выполняется условие:

$$\bar{x} - \Delta\bar{x} \le A \le \bar{x} + \Delta\bar{x} \quad (4.1)$$

т. е.

$$A = \bar{x} \pm \Delta\bar{x} \quad (4.2)$$

или с использованием относительных величин:

$$\frac{A}{\overline{x}} = 1 \pm D_{\overline{x},r} \quad . \qquad (4.2a)$$

Если при измерениях получают логарифмы исходных вариант, в графе 9 табл. 4.1 приводят величину $D_{lg\,\overline{x}}$, а каждую из граф 3, 9 и 10 разбивают на две (а, б). В графе 3а приводят значение $\overline{x}_g$, в графе 3б – значение $lg\,\overline{x}_g$, в графах 9а и 9б — соответственное значения нижней и верхней границ доверительного интервала для $\overline{x}_g$ (см. уравнения 1.24 и 1.25). Наконец, в графе 10 приводят максимальное по абсолютной величине значение ε (см. уравнение 1.28а).

5. Сравнение средних результатов двух выборок

Если в результате измерений одной и той же величины *А* получены две выборки объема n_1 и n_2 причем $\overline{x}_1 \neq \overline{x}_2$, может возникнуть необходимость проверки статистической достоверности гипотезы:

$$\overline{x}_1 = \overline{x}_2 \qquad (5.1)$$

т.е. значимости разности ($\overline{x}_1 - \overline{x}_2$).

Такая проверка необходима, если величина *А* определялась двумя разными методиками с целью их сравнения, или если величина *А* определялась одной и той же методикой для двух разных объектов, идентичность которых требуется доказать. Для проверки гипотезы (5.1) следует установить, существует ли статистически значимое различие между дисперсиями s_1^2 и s_2^2. Эта проверка проводится так, как указано в разделе 3.

Рассмотрим три случая.

5.1. Различие дисперсий s_1^2 и s_2^2 статистически незначимо (справедливо неравенство 3.3). В этом случае средневзвешенное значение s^2 вычисляют по уравнению (2.1), а дисперсию s_P^2 разности $|\overline{x}_1 - \overline{x}_2|$ —по уравнению (5.2):

$$S_P^2 = \frac{s^2 \times (n_1 + n_2)}{n_1 \times n_2} \qquad (5.2)$$

$$S_P = \sqrt{S_P^2} \qquad (5.3)$$

Далее вычисляют критерий Стьюдента:

$$t = \frac{|\overline{x}_1 - \overline{x}_2|}{S_P} = \frac{|\overline{x}_1 - \overline{x}_2|}{s} \sqrt{\frac{n_1 \times n_2}{n_1 + n_2}} \qquad (5.4)$$

$$n = n_1 + n_2 - 2 \qquad (5.5)$$

Если при выбранном значении P_2 (например, при P_2 = 95%)

$$t > t(P_2, n) \qquad (5.6)$$

то результат проверки положителен - разность ($\bar{x}_1 - \bar{x}_2$) является значимой, и гипотезу $\bar{x}_1 = \bar{x}_2$ отбрасывают. В противном случае надо признать, что эта гипотеза не противоречит экспериментальным данным.

5.2. Различие значений s_1^2 и s_2^2 статистически значимо (справедливо неравенство 3.2). Если $s_1^2 > s_2^2$, дисперсию s_P^2 разности ($\bar{x}_1 - \bar{x}_2$) находят по уравнению (5.7), а число степеней свободы n' — по уравнению (5.8):

$$S_P^2 = \frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2} \qquad (5.7)$$

$$n' = (n_1 + n_2 - 2) \times \left(0{,}5 + \frac{s_1^2 \times s_2^2}{s_1^4 + s_2^4}\right) \qquad (5.8)$$

Следовательно, в данном случае

$$t = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{S_P} = |\bar{x}_1 - \bar{x}_2| \times \sqrt{\frac{n_1 \times n_2}{n_2 \times s_1^2 + n_1 \times s_2^2}} \qquad (5.9)$$

Вычисленное по уравнению (5.9) значение *t* сравнивают с табличным значением *$t(P_2, n')$,* как это описано выше для случая 1.

Рассмотрение проблемы упрощается, когда $n_1 \approx n_2$ и $s_1^2 >> s_2^2$. Тогда в отсутствие систематической погрешности среднее $\bar{x}_2$ выборки объема n_2 принимают за достаточно точную оценку величины *A*, т.е. принимают $\bar{x}_2 = m$. Справедливость гипотезы $\bar{x}_1 = m$, эквивалентной гипотезе (5.1), проверяют с помощью выражений (2.7) и (2.8), принимая $n_1 = n_1 — 1$. Гипотеза (5.1) отклоняется, как статистически недостоверная, если выполняется неравенство (2.8).

5.3. Известно точное значение величины А.

Если $A = m$, проверяют две гипотезы: $\bar{x}_1 = m$ и $\bar{x}_2 = m$. Проверку выполняют так, как описано в разделе 2 с помощью выражений (2.7) и (2.8), отдельно для каждой из гипотез. Если обе проверяемые гипотезы статистически достоверны, то следует признать достоверной и гипотезу (5.1). В противном случае гипотеза (5.1) должна быть отброшена.

Если при измерениях получают логарифмы исходных вариант, при сравнении средних используют величины $lg\,\bar{x}_g$, s_{lg}^2 и s_{lg}.

В тех случаях, когда разность ($\bar{x}_1 - \bar{x}_2$) оказывается значимой, определяют доверительный интервал для разности соответствующих генеральных средних ($\hat{x}_1 - \hat{x}_2$)

$$\left|\bar{x}_1-\bar{x}_2\right|-t(P_2,n)\times s_P \le \left|\hat{x}_1-\hat{x}_2\right| \le \left|\bar{x}_1-\bar{x}_2\right|+t(P_2,n)\times S_P \qquad (5.10)$$

6. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА, ПОЛУЧЕННЫХ С ПОМОЩЬЮ МЕТРОЛОГИЧЕСКИ АТТЕСТОВАННОЙ МЕТОДИКИ.

Данная интерпретация основывается на том, что для метрологически аттестованной методики известна принятая оценка стандартного отклонения.

6.1. Оценка сходимости результатов параллельных определений.

При рутинных анализах аналитик обычно проводит два-три, реже четыре параллельных определения. Варианты полученной при этом упорядоченной выборки объема *m,* как правило, довольно значительно отличаются друг от друга. Если методика анализа метрологически аттестована, то максимальная разность результатов двух параллельных определений должна удовлетворять неравенству:

$$\left|x_1-x_n\right| < L(P,m)\times s \qquad (6.1)$$

где s – принятая оценка стандартного отклонения, $L(P, m)$— фактор, вычисленный по Пирсону при P = 95%.

m	2	3	4
L	2,77	3,31	3,65

Если неравенство (6.1) не выполняется, необходимо провести дополнительное определение и снова проверить, удовлетворяет ли величина $|x_1–x_n|$ неравенству (6.1).

Если для результатов четырех параллельных определений неравенство (6.1) не выполняется, следует считать, что конкретные условия анализа привели к снижению воспроизводимости методики и принятая оценка величины s применительно к данному случаю является заниженной. В этом случае поступают, как указано в разделе 1.2.

6.2. Определение необходимого числа параллельных определений.

Если необходимо получить средний результат $\bar{x}$ с относительной неопределенностью $\bar{e} \le j$ (где j - некоторое число, например, 2%) , причем методика анализа метрологически аттестован, необходимое число параллельных определений m находят из уравнения

$$m \ge \left(\frac{D_x \times 100}{j \times \bar{x}}\right)^2 \qquad (6.2)$$

6.3. ГАРАНТИЯ КАЧЕСТВА ПРОДУКЦИИ.

Описанный ниже подход применим к метрологически аттестованной методике. В других случаях могут применяться иные подходы (см. общую статью «Валидация аналитических методик и испытаний»).

Предположим, что качество продукции регламентируется предельными значе-

ниями a_{min} и a_{max} величины A , которую определяют на основании результатов анализа. Примем, что вероятность соответствия качества продукта условию

$$a_{min} < A < a_{max} \qquad (6.3)$$

должна составлять P_1.

Пусть величину A находят экспериментально как среднее выборки объема m, а методика ее определения метрологически аттестована. Тогда условие (6.3) будет выполняться с вероятностью P_1, если значение $\overline{x} = A$ будет лежать в пределах

$$a_{min} + D_{\overline{A}} < A < a_{max} - D_{\overline{A}} \qquad (6.4)$$

где:

$$D_{\overline{A}} = \frac{U(P_1) \times s}{\sqrt{m}} \qquad (6.5)$$

Значения коэффициента U для вероятности P_1 = 95% и P_1 = 99% соответственно равны 1,65 и 2,33.

Иными словами, для гарантии качества наблюдаемые пределы изменения величины A на практике следует ограничить значениями:

$$A_{min} = a_{min} + D_{\overline{A}} = A_{min} + \frac{U(P_1) \times s}{\sqrt{m}} \qquad (6.6)$$

$$A_{max} = a_{max} - D_{\overline{A}} = A_{max} - \frac{U(P_1) \times s}{\sqrt{m}} \qquad (6.7)$$

Наоборот, если заданы значения A_{min} и A_{max}, значения a_{min} и a_{max}, входящие в неравенство (6.3), могут быть найдены путем решения уравнений (6.6) и (6.7). Наконец, если заданы пары значений A_{min}, a_{min} и A_{max}, a_{max}, то уравнения (6.6) и (6.7) могут быть решены относительно m. Это может быть использовано для оценки необходимого числа параллельных определений величины A.

Если при измерениях получают логарифмы исходных вариант, описанные в разделе 6 вычисления проводят с использованием величин $\overline{lg\, x_g}$, $lg\, x_i$, s_{lg} и т.п.

Примеры расчетов приведены в разделе 9.7.

7. РАСЧЕТ И СТАТИСТИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ПАРАМЕТРОВ ЛИНЕЙНОЙ ЗАВИСИМОСТИ

При использовании ряда химических и физико-химических методов количественного анализа непосредственному измерению подвергается некоторая величина y, которая является линейной функцией искомой концентрации (количества) x определяемого вещества или элемента. Иными словами, в основе таких методов анализа лежит существование линейной зависимости:

$$y = bx + a \qquad (7.1)$$

где y - измеряемая величина; x - концентрация (количество) определяемого вещества или элемента; b - угловой коэффициент линейной зависимости; a - свободный член линейной зависимости.

Для использования зависимости (7.1) в аналитических целях, т. е. для определения конкретной величины x по измеренному значению y, необходимо заранее найти числовые значения констант b и a, т.е. провести калибровку. Иногда константы функ-

ции (7.1) имеют тот или иной физический смысл, и их значения должны оцениваться с учетом соответствующего доверительного интервала. Если калибровка проведена, и значения констант *a* и *b* определены, величину *x* находят по измеренному значению y_i:

$$x_i = \frac{1}{b} y_i - \frac{a}{b} \quad (7.2)$$

При калибровке величину *x* рассматривают как аргумент, а величину *y* - как функцию. Наличие линейной зависимости между *x* и *y* не всегда является очевидным. По этой причине экспериментальные данные, полученные при калибровке, в первую очередь используют для оценки жесткости, т. е. степени неслучайности линейной связи между *x* и *y,* и лишь затем определяют значения констант *a* и *b* и их доверительные интервалы. В первом приближении судить о жесткости линейной связи между переменными *x* и *y* можно по величине линейного коэффициента корреляции (или просто, коэффициента корреляции) *r*, который вычисляют по уравнению:

$$r = \frac{m\sum_{1}^{m} x_i y_i - \sum_{1}^{m} x_i \times \sum_{1}^{m} y_i}{\sqrt{\left[m \times \sum_{1}^{m} x_i^2 - \left(\sum_{1}^{m} x_i\right)^2\right]\left[m \times \sum_{1}^{m} y_i^2 - \left(\sum_{1}^{m} y_i\right)^2\right]}} \quad (7.3)$$

исходя из экспериментальных данных.

Линейный коэффициент корреляции *r* изменяется в пределах от –1 до +1. Положительные значения *r* указывают на рост, а негативные – на уменьшение *y* с ростом *x*.

Линейный коэффициент корреляции *r* является частным случаем общего индекса корреляции R_c , который применим также и для нелинейных зависимостей между величинами *y* и *x* :

$$R_c = \sqrt{1 - \frac{s_0^2}{s_y^2}} \quad (7.3a)$$

где:

s_o - остаточное стандартное отклонение (уравнение 7.7),

s_y - стандартное отклонение величин y_i относительно среднего значения $\overline{y}$ (уравнение 7.15); рассчитывают с использованием уравнения (1.5).

Уравнение (7.3а), в силу своей простоты и наглядности, нередко используется вместо соотношения (7.3) в том случае, когда знак коэффициента корреляции не имеет значения.

Чем ближе абсолютная величина |*r*| к единице, тем менее случайна наблюдаемая линейная зависимость между переменными *x* и *y.*

Коэффициент корреляции *r* используется обычно для выявления стахостической взаимосвязи между величинами, функциональная зависимость между которыми может и отсутствовать. Коэффициент корреляции является значимым, если его величина для данной вероятности *P* и числа степеней свободы n превышает значения, приведенные в Таблице 11.6. В противоположном случае нельзя говорить о существовании значимых зависимостей (7.1-7.2).

Значимость коэффициента корреляции является обязательным, но не достаточным условием использования уравнений (7.1-7.2) для аналитических целей (см. ниже). В аналитической химии в большинстве случаев используют линейные зависимости с коэффициентом корреляции $|r| \geq 0.98$ (при соответствии требованиям Таблицы 11.6) и только при анализе следовых количеств рассматривают линейные зависимости с коэффициентом корреляции $|r| \geq 0.9$.

Коэффициенты *a* и *b* и другие метрологические характеристики зависимости (7.1) рассчитывают с использованием метода наименьших квадратов по экспериментально измеренным значениям переменной *y* для заданных значений аргумента *x*. Пусть в результате эксперимента найдены представленные в Таблице 7.1 пары значений аргумента *x* и функции *y*.

Таблица 7.1

i	x_i	y_i
1	x_1	y_1
2	x_2	y_2
...	...	...
m	x_m	y_m

Тогда, если величины y_i имеют одинаковую неопределенность (а такое допущение обычно выполняется для достаточно узкого диапазона варьирования величин y_i), то:

$$b = \frac{m \times \sum_1^m x_i y_i - \sum_1^m x_i \times \sum_1^m y_i}{m \times \sum_1^m x_i^2 - \left(\sum_1^m x_i \right)^2} \qquad (7.4)$$

$$a = \frac{\sum_1^m y_i - b \times \sum_1^m x_i}{m} \qquad (7.5)$$

$$n = m - 2 \qquad (7.6)$$

Если полученные значения коэффициентов *a* и *b* использовать для вычисления значений *y* по заданным в Таблице 7.1 значениям аргумента *x* согласно зависимости (7.1), то вычисленные значения *y* обозначают через Y_1, Y_2, ... Y_i, ... Y_n. Разброс значений y_i относительно значений Y_i характеризует величина остаточной дисперсии s_0^2, которую вычисляют по уравнению:

$$s_0^2 = \frac{\sum_1^m (y_i - Y_i)^2}{n} = \frac{\sum_1^m y_i^2 - a\sum_1^m y_i - b\sum_1^m x_i y_i}{n} \qquad (7.7)$$

Для того, чтобы уравнения (7.1-7.2) адекватно описывали экспериментальные данные, необходимо, чтобы остаточная дисперсия s_0^2 не отличалась значимо по критерию Фишера (соотношения 3.1-3.4) от дисперсии воспроизводимости (сходимости) величин y_i . Последняя может быть найдена экспериментально или спрогнозирована (см. Главу 10) из паспортных данных оборудования.

В свою очередь дисперсии констант *b* и *a* находят по уравнениям:

$$s_b^2 = \frac{ms_0^2}{m\sum_1^m x_i^2 - \left(\sum_1^m x_i\right)^2} \quad (7.8)$$

$$s_a^2 = \frac{s_b^2}{m}\sum_1^m x_i^2 \quad (7.9)$$

Стандартные отклонения s_b и s_a и величины D_b и D_a, необходимые для оценки доверительных интервалов констант, рассчитывают по уравнениям:

$$s_b = \sqrt{s_b^2} \quad (7.10)$$

$$s_a = \sqrt{s_a^2} \quad (7.11)$$

$$D_b = t(P_2; n) \times s_b \quad (7.12)$$

$$D_a = t(P_2; n) \times s_a \quad (7.13)$$

Коэффициенты *a* и *b* должны значимо отличаться от нуля, т.е. превышать, соответственно, величины D_a и D_b.

Уравнению (7.1) с константами *a* и *b* обязательно удовлетворяет точка с координатами $\bar{x}$ и $\bar{y}$, называемая центром калибровочного графика:

$$\bar{x} = \frac{\sum_1^m x_i}{m} \quad (7.14)$$

$$\bar{y} = \frac{\sum_1^m y_i}{m} \quad (7.15)$$

Наименьшие отклонения значений y_i от значений Y_i наблюдаются в окрестностях центра графика. Стандартные отклонения s_y и s_x величин *y* и *x*, рассчитанных соответственно по уравнениям (7.1) и (7.2) исходя из известных значений *x* и *y*, определяются с учетом удаления последних от координат центра графика:

$$s_y = \sqrt{s_0^2\left[\frac{1}{m} + \frac{m(x-\bar{x})^2}{m\sum_1^m x_i^2 - \left(\sum_1^m x_i\right)^2}\right]} \quad (7.16)$$

$$s_x = \sqrt{\frac{s_0^2}{b^2}\left[\frac{1}{n_j} + \frac{1}{m} + \frac{m(\overline{y_j} - \bar{y})^2}{b^2\left[m\sum_1^m x_i^2 - \left(\sum_1^m x_i\right)^2\right]}\right]} \quad (7.17)$$

где:

$\overline{y}_j$ - среднее значение;

n_j - число вариант, использованных при определении $\bar{y}_j$.

При $X = \bar{X}$ и $\bar{y}_i = \bar{y}$:

$$s_y = \sqrt{\frac{s_0^2}{m}} \qquad (7.16а)$$

$$s_x = \sqrt{\frac{s_0^2}{b^2}\left[\frac{1}{n_j} + \frac{1}{m}\right]}.$$

С учетом значений s_y и s_x могут быть найдены значения величин Δ_y и Δ_x.

$$\Delta_y = s_y \times t(P_2;n) \qquad (7.18)$$

$$\Delta_x = s_x \times t(P_2;n) \qquad (7.19)$$

Значения s_x и Δ_x, найденные при $n_i = 1$, являются характеристиками воспроизводимости (сходимости) аналитической методики, если x - концентрация, а y - функция x.

Обычно результаты статистической обработки по методу наименьших квадратов сводят в Таблицу 7.2.

Таблица 7.2

Результаты статистической обработки экспериментальных данных, полученных при изучении линейной зависимости вида $y = bx + a$

n	$\bar{X}$	$\bar{y}$	b	a	$t(P_2;n)$ при P_2=95%	Δ_b	Δ_a	s_0^2	r	s_x при n_j=1 $y_j = \bar{y}$	Δ_x	$\Delta_{x,r} \times 100$
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13

Примечание 1. Если целью экспериментальной работы являлось определение констант *b* и *a,* графы 11, 12 и 13 Таблицы 7.2 не заполняются.

Примечание 2. Если $y = b\lg x + a$, вычисления, описанные в разделе 7, выполняют с использованием уравнений (1.8), (1.9), (1.22 – 1.25).

Примечание 3. Сравнение дисперсий s_0^2, полученных в разных условиях для двух линейных зависимостей, может быть проведено, как указано в разделе 3.

8. ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНАЯ СХЕМА СТАТИСТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА РЕЗУЛЬТАТОВ ХИМИЧЕСКИХ ИЗМЕРЕНИЙ

Традиционно в фармакопейном анализе преобладают методы статистического анализа с фиксированным объемом выборки. Наряду с этим в последние годы все шире применяются методы так называемого последовательного (секвенционального) анализа[6]. Использование этих методов имеет смысл в тех случаях, когда выполнение каждого анализа дорого, трудоемко или отнимает много времени, и при этом имеется возможность анализировать результаты последовательно, по мере их поступления.

Частным случаем последовательной схемы является метод проверки с двукратной выборкой. Такой метод применяется в фармакопейном анализе, например, при контроле однородности дозирования: берется первая выборка, и по полученным ре-

[6] См., например, D. Siegmund. Sequential Analysis. Springer-Verlag. 1985.

зультатам партия либо проходит, либо бракуется, либо принимается решение взять вторую выборку. Такая схема позволяет сэкономить (в среднем) число наблюдений, необходимое для принятия решения. Еще более экономична последовательная схема в общем виде. По данным[7] коэффициент выгоды при сопоставлении с традиционными схемами (фиксированный объем выборки) колеблется между двумя и тремя.

Последовательный критерий для различения двух простых гипотез

H_0: выборка извлечена из генеральной совокупности $f(x, \mu_0, s)$;

H_1: выборка извлечена из генеральной совокупности $f(x, \mu_1, s)$

предложен Вальдом[8] (здесь $f(x, \mu, s)$ – функция плотности вероятности нормального распределения). Критическая статистика $g^{(n)}$ (n - число наблюдений) задается в виде:

$$g^{(n)} = \sum_{i=1}^{n} ln \frac{f(x_i, m_1, s)}{f(x_i, m_2, s)} \qquad n = 1,2... \tag{8.1}$$

Область возможных значений критической статистики разбивается на три (а не на две, как в случае выборок фиксированного объема) части:

1) область принятия гипотезы H_0

$$g^{(n)} \le ln \frac{b}{1-a} \tag{8.2}$$

2) область принятия гипотезы H_1

$$g^{(n)} \ge ln \frac{1-b}{a} \tag{8.3}$$

3) область продолжения наблюдений

$$ln \frac{b}{1-a} < g^{(n)} < ln \frac{1-b}{a} \tag{8.4}$$

Здесь:

a - погрешность первого рода (вероятность принятия гипотезы H_1, в то время как на самом деле верна гипотеза H_0);

b - погрешность второго рода (вероятность принятия гипотезы H_0, в то время как на самом деле верна гипотеза H_1).

Если результаты n испытаний рассматривать как случайную выборку из генеральной совокупности, подчиняющейся нормальному распределению с дисперсией s^2 (которая предполагается известной из предыдущих экспериментов), то

$$g^{(n)} = \frac{m_1 - m_0}{s^2} \sum x_i + \frac{n}{2s^2}\left(m_0^2 - m_1^2\right) \tag{8.5}$$

Если значение критической статистики, вычисленное на шаге n, попадает в область 1), то принимается гипотеза H_0; если оно попадает в область 2), то принимается гипотеза H_1; если значение критической статистики попадает в область 3), то производится еще одно измерение. Доказано, что с вероятностью 1 этот процесс заканчивается принятием одной из двух альтернативных гипотез.

---

[7] С.А. Айвазян Теор. вер. и ее примен. – 1959. – Т. 4. - № 1. – С. 87-93.

[8] А. Вальд. Последовательный анализ. М.: Физматгиз. 1960.

Критерий Вальда является оптимальным в том смысле, что среди всех последовательных критериев он требует минимального среднего числа наблюдений при заданных значениях погрешности первого и второго рода.

На практике вычисления могут быть организованы следующим образом. На график наносят четыре прямые, задаваемые уравнениями, в которых n – номер испытания.

$$T_0 = a_0 + bn \tag{8.6a}$$

$$T_1 = a_1 + bn \tag{8.6b}$$

$$T_0' = a_0' + b'n \tag{8.6c}$$

$$T_1' = a_1' + b'n \tag{8.6d}$$

В этих уравнениях

$$a_0 = a_0' = \frac{s}{d_m} ln \frac{b}{1 - \frac{a}{2}} \tag{8.7a}$$

$$a_1 = a_1' = \frac{s}{d_m} ln \frac{1 - b}{\frac{a}{2}} \tag{8.7b}$$

где:

s - стандартное отклонение метода, которое предполагается известным;

b и *b'* - верхний и нижний пределы содержания анализируемого вещества в образце;

d_μ = |μ_2 - μ_1| – разность генеральных средних генеральных совокупностей *f(x* , μ_0 ,s*)* и *f(x* , μ_0 ,s*)*; d_μ задается экспериментатором и характеризует способность метода различать эти генеральные совокупности.

Прямые (8.6a-8.6d) разбивают плоскость на 5 областей (см. Рис. 8.1). Область 3 – это область принятия гипотезы H_0; области 1 и 5 – области принятия гипотезы H_1, области 2 и 4 – области продолжения наблюдений. Чем меньше s и больше d_μ , тем более узкими являются области 2 и 4 и тем быстрее сходится метод.

Испытания проводятся последовательно. После каждого испытания по оси ординат откладывается накопительная сумма полученных результатов. В зависимости от того, куда попадает очередная точка, принимается одно из трех возможных решений: попадание точки в область 3 означает, что образец выдерживает испытание; попадание в область 1 или 5 означает, что образец не выдерживает испытание; если точка попадает в область 2 или 4, то испытания должны быть продолжены.

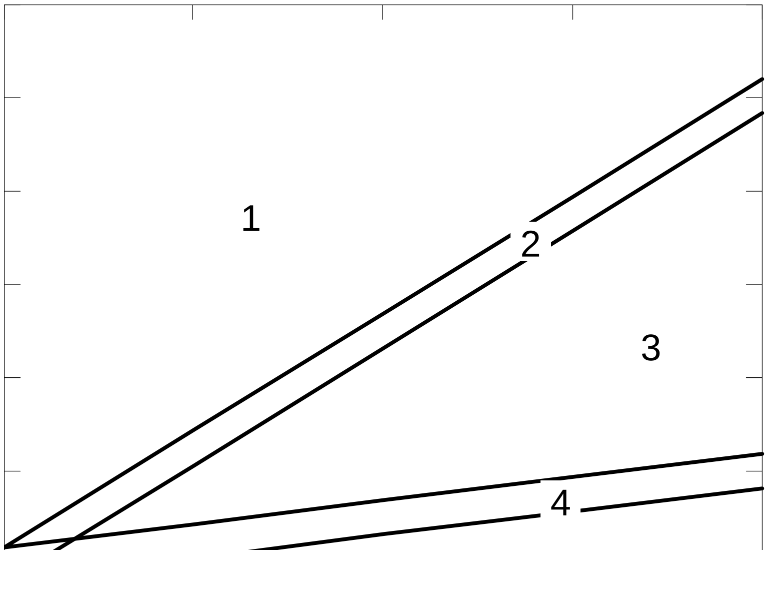


Рис. 8.1. Практическая организация схемы последовательных испытаний

Более конкретно применение секвенционального анализа описано в примере 9.8.

9. ПРИМЕРЫ

9.1 Вычисление среднего значения и дисперсии.

При определении содержания стрептоцида в образце линимента были получены следующие данные.

Таблица 9.1

i	1	2	3	4	5
x_i, %	9,52	9,55	9,83	10,12	10,33

n = 5; n = n-1 = 5-1 = 4.

$$\bar{x} = \frac{\sum_1^n x_i}{n} = \frac{9{,}52 + 9{,}55 + 9{,}83 + 10{,}12 + 10{,}33}{5} = 9{,}87$$

$$d_i = |x_i - \bar{x}| = |x_i - 9{,}87| \text{ т.е. } d_1 = |9{,}52 - 9{,}87| = 0{,}35 \text{ и т.д.}$$

$$s^2 = \frac{\sum_1^n d_i^2}{n} = \frac{\sum_1^n x_i^2 - n\bar{x}^2}{n} = \frac{(9{,}52^2 + 9{,}55^2 + 9{,}83^2 + 10{,}12^2 + 10{,}33^2) - 5 \times 9{,}87^2}{4} =$$

$$= 0{,}1252$$

$$s = \sqrt{s^2} = \sqrt{0{,}1252} = 0{,}3538$$

$$s_r = \frac{s}{\bar{x}} = \frac{0{,}3538}{9{,}87} = 0{,}03585$$

$$RSD = s_r \times 100 = 3{,}59\%$$

$$s_{\bar{x}} = \frac{s}{\sqrt{n}} = \frac{0{,}3538}{\sqrt{5}} = 0{,}1582$$

$$s_{\bar{x},r} = \frac{s_{\bar{x}}}{\bar{x}} = \frac{0{,}1582}{9{,}87} = 0{,}01603$$

$$RSD_{\bar{x}} = s_{\bar{x},r} \times 100 = 1{,}60\%.$$

9.2 Проверка однородности выборки малого объема

При проведении девяти (n=9) определений содержания общего азота в плазме крови

крыс были получены следующие данные (в порядке возрастания):

Таблица 9.2

i	1	2	3	4	5	6	7	8	9
x_i, %	0,62	0,81	0,83	0,86	0,87	0,90	0,94	0,98	0,99

По уравнениям 1.10 и 1.11а находим:

$$R = |x_1 - x_{n-1}| = |0{,}62 - 0{,}98| = 0{,}36$$

$$Q_1 = \frac{|x_1 - x_2|}{R} = \frac{|0{,}62 - 0{,}81|}{0{,}36} = 0{,}53$$

По Таблице 11.1 Приложения находим:

$$Q(9;95\%) = 0{,}46 < Q_1 = 0{,}53$$
$$Q(9;99\%) = 0{,}55 > Q_1 = 0{,}53$$

Следовательно, гипотеза о том, что значение x_1 = 0,62 должно быть исключено из рассматриваемой совокупности результатов измерений как отягощенное грубой погрешностью, может быть принята с доверительной вероятностью 95%, но должна быть отвергнута, если выбранное значение доверительной вероятности равно 99%.

9.3. Вычисление доверительных интервалов и неопределенностей измерений.

В результате определения содержания хинона в стандартном образце хингидрона были получены следующие данные (n=10).

Таблица 9.3

i	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
x_i,%	49,80	49,83	49,87	49,87	49,92	50,01	50,05	50,06	50,10	50,11

Расчеты по формулам (1.2, 1.4 – 1.7) дали следующие результаты:

$\bar{x} = 49{,}96$; n = 9; s^2 = 0,01366; s = 0,1169; $s_{\bar{x}} = 0{,}03696$

Доверительные интервалы результата отдельного определения и среднего результата при P_2 = 90% получаем согласно (1.18) и (1.16):

$$x_i \pm D_x = x_i \pm t(P_2, n) \times s = x_i \pm t(90\%, 9) \times s = x_i \pm 1{,}83 \times 0{,}1169 = x_i \pm 0{,}21$$

$$\bar{x} \pm D_{\bar{x}} = \bar{x} \pm \frac{t(P_2,n)\times s}{\sqrt{n}} = 49{,}96 \pm \frac{1{,}83\times 0{,}1169}{\sqrt{10}} = 49{,}96 \pm 0{,}07$$

Тогда относительные неопределенности e и $\bar{e}$, согласно (1.21) и (1.21), равны:

$$e = \frac{D_x}{\bar{x}}\times 100\% = \frac{0{,}21}{49{,}96}\times 100\% = 0{,}42\%$$

$$\bar{e} = \frac{D_{\bar{x}}}{\bar{x}}\times 100\% = \frac{0{,}07}{49{,}96}\times 100\% = 0{,}14\%$$

Обозначая истинное содержание хинона в хингидроне через m, можно считать, что с 90% доверительной вероятностью справедливы неравенства:

$$m - 0{,}21 \le x_i \le m + 0{,}21$$

$$x_i - 0{,}21 \le m \le x_i + 0{,}21 \quad \text{(при любом } i\text{)}$$

$$m - 0{,}07 \le \bar{x} \le m + 0{,}07; \qquad \bar{x} - 0{,}07 \le m \le \bar{x} + 0{,}07$$

(при n=10)

9.4. Проверка гипотезы равенства дисперсий.

9.4.1. Объединение результатов выборок разного объема.

В процессе проведения внутрилабораторных исследований неопределенности методики титрования субстанции ацетилсалициловой кислоты четырьмя (т.е. g = 4, n_c = 3) разными аналитиками получены средние значения $\bar{x}_k$ и относительные стандартные отклонения (RSD_k%) для указанного числа опытов (n_k), представленные ниже в Таблице 9.4.1.

Можно ли считать данные RSD_k выборками из одной генеральной совокупности и каковы объединенное $\bar{x}$ и RSD_{tot} ?

Таблица 9.4.1.

№	$\bar{x}_k$	RSD_k %	n_k	n_k	n_t	RSD^2_{tot}	RSD_{tot} %	c^2	**5.4. C**	c^{*2}	Табличное c^2(P_1=95%, n_c = 3)
1	99,9	0,3	5	4							
2	99,4	0,8	7	6							
3	99,2	0,7	9	8	25	0,552	0,74	4,62	1,072	4,31	7,815
4	99,3	0,9	8	7							

Вначале проверим гипотезу равенства дисперсий, т.е. что все RSD_k являются выборками из одной генеральной совокупности.

Рассчитаем величины n_t по формуле (2.2):

$$n_t = \sum_{k=1}^{g} n_k = 4 + 6 + 8 + 7 = 25$$

По формуле (2.1) рассчитываем RSD^2_{tot} :

$$RSD^2_{tot} = \frac{\sum_{k=1}^{k=g} n_k \times RSD^2_k}{n_t} = \frac{4 \times 0{,}3^2 + 6 \times 0{,}8^2 + 8 \times 0{,}7^2 + 7 \times 0{,}9^2}{25} = 0{,}552$$

Теперь по формуле (2.4) рассчитаем c^2 :

$$c^2 = 2{,}303 \times \left(n_t \times \lg RSD^2_{tot} - \sum_{k=1}^{g} n_k \times \lg RSD^2_k \right) =$$

$$= 2{,}303 \times (25 \times \lg 0{,}552 - (4 \times \lg 0{,}09 + 6 \times \lg 0{,}64 + 8 \times \lg 0{,}49 + 7 \times \lg 0{,}81)) = 4{,}62$$

Табличное значение (по таблице 11.4) $c^2(P_1 = 0{,}95,\ n_c = 3) = 7{,}815 > 4{,}62$.

Таким образом, значение c^2 меньше критического, поэтому можно принять гипотезу о равенстве дисперсий.

Значение c^2 меньше критического, и поэтому нет необходимости в расчете корректирующего фактора C и величины c^{*2} . Для иллюстрации рассчитаем и эти величины по формуле (2.5):

$$C = \frac{[(1/4) + (1/6) + (1/8) + (1/7)] - (1/25)}{3 \times (4 - 1)} + 1 = 1{,}072$$

$$c^{*2} = \frac{c^2}{C} = \frac{4{,}62}{1{,}072} = 4{,}31$$

Как видно, значение c^{*2} еще меньше критического значения (7,815), что подтверждает гипотезу о равенстве дисперсий.

Рассчитаем объединенное RSD_{tot} :

$$RSD_{tot} = \sqrt{RSD^2_{tot}} = \sqrt{0{,}552} = 0{,}74\%$$

Рассчитаем объединенное среднее $\bar{x}$ по всем четырем выборкам по формуле (2.3):

$$\bar{x} = \frac{99{,}9 \times 5 + 99{,}4 \times 7 + 99{,}2 \times 9 + 99{,}3 \times 8}{5 + 7 + 9 + 8} = 99{,}4\%.$$

Таким образом, по данным внутрилабораторных исследований, относительное стандартное отклонение титрования субстанции ацетилсалициловой кислоты равно 0,74%, а ее содержание – 99,4%.

9.4.2. Объединение результатов выборок одинакового объема.

При анализе методом ВЭЖХ пяти различных серий (т.е. $g = 5$) лекарственного средства получены следующие значения относительных стандартных отклонений ($RSD_i\%$) площадей пиков при трехкратном (т.е. $n = 3$) хроматографировании раствора каждой серии:

1,08%; 0,60%; 0,43%, 1,59% и 0,71%.

Можно ли объединять данные выборки (результаты анализа пяти серий) и каково объединенное относительное стандартное отклонение?

Поскольку в нашем случае число степеней свободы для всех пяти выборок (серий) одинаково и равно n = n - 1 = 3 - 1 = 2, то для проверка гипотезы равенства дисперсий применим критерий Кохрейна (см. раздел 2.1.3 и Таблицу 11.4). В нашем случае s_{max} = 1,59%, n = 2, g = 5, и соотношение (2.6) дает:

$$G = \frac{s^2_{max}}{\sum_{k=1}^{g} s_k^2} = \frac{1{,}59^2}{1{,}08^2 + 0{,}60^2 + 0{,}43^2 + 1{,}59^2 + 0{,}71^2} = 0{,}533 < 0{,}684 = G(P = 0{,}95;2;5)$$

Как видно, рассчитанное значение G меньше табличного на 95% уровне значимости. Следовательно, данные выборки можно объединить.

Рассчитаем по уравнению (2.2) объединенное число степеней свободы:

$$n_t = \sum_{k=1}^{g} n_k = 5 \times 2 = 10$$

Рассчитаем по формуле (2.1b) объединенное относительное стандартное отклонение (RSD_{tot}):

$$RSD^2_{tot} = \frac{\sum_{k=1}^{k=g} n_k \times RSD_k^2}{n_t} = \frac{2 \times (1{,}08^2 + 0{,}60^2 + 0{,}43^2 + 1{,}59^2 + 0{,}71^2)}{10} = 0{,}9510$$

Отсюда $RSD_{tot} = \sqrt{0{,}9510} = 0{,}98$.

9.5. Сравнение двух методик анализа по воспроизводимости.

Пусть для двух выборок аналитических данных (1 и 2), характеризующих, например, различные методики анализа, получены метрологические характеристики, приведенные в графах 1—10 таблицы 9.5.:

Таблица 9.5

№ выборки	m	n	$\bar{x}$, %	s	P_2, %	$t(P_2,n)$ (табл)	Dx	e	$t_{выч}$	$F(P_1, n_1, n_2)$ (табл) P=99%	$F_{выч}$	d
1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**	**13**
1	100	20	100,13	0,464	95	2,09	0,97	0,97	1,28	3,36	17,92	-
2	100	15	98,01	0,110	95	2,13	0,23	0,24	72,36	3,36	17,92	1,99

Для заполнения графы 10 вычислим значения t_1 и t_2:

$$t_1 = \frac{|m - \bar{x}_1| \times \sqrt{m_1}}{s_1} = \frac{|100 - 100{,}13| \times \sqrt{20+1}}{0{,}464} = 1{,}28$$

$$t_2 = \frac{|m - \bar{x}_2| \times \sqrt{m_2}}{s_2} = \frac{|100 - 98{,}01| \times \sqrt{15+1}}{0{,}110} = 72{,}36$$

Поскольку t_1=1,28 < t_1(95%, 20)=2,09, гипотеза $|m_1 - \bar{x}_1| \neq 0$ может быть отвергнута, что позволяет считать результаты выборки 1 свободными от систематической погрешности.

Напротив, поскольку t_2=72,36 >> t_2(95%, 15)=2,13, гипотезу $|m_2 - \bar{x}_2| \neq 0$ приходится признать статистически достоверной, что свидетельствует о наличии систематической погрешности в результатах выборки 2. В графу 13 вносим:

$$d_2 = \frac{|m_1 - \bar{x}_2|}{m_1} \times 100\% = \frac{|100 - 98{,}01|}{100} \times 100\% = 1{,}99\%$$

Заполним графы 11 и 12:

$$F(99\%;20;15) = 3{,}36$$

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} = \frac{0{,}215}{0{,}012} = 17{,}92$$

$$F = 17{,}92 >> F(99\%;20;15) = 3{,}36$$

Следовательно, при P_1 = 99% гипотезу о различии дисперсий s_1^2 и s_2^2 следует признать статистически достоверной.

<u>Выводы</u>:

а) результаты, полученные при использовании первой методики, являются правильными, т. е. они не отягощены систематической погрешностью;

б) результаты, полученные при использовании второй методики, отягощены систематической погрешностью;

в) по воспроизводимости вторая методика существенно лучше первой методики.

При проведении совместной статистической обработки нескольких выборок, полученных при анализе образцов с разным содержанием определяемого компонента m, данные в графах 1, 2, 3, 4, 7 и 8 табл. 2.1 приводят отдельно для каждой выборки. При этом в графах 2, 4, 6, 7 в последней строке под чертой приводят обобщенные значения n , s, t, D_x.

Если для вычисления метрологических характеристик методики используются данные аналитического архива, значение m не известно и, соответственно, заполняются не все графы таблицы 2.1.

9.6. Сравнение средних результатов двух выборок.

При определении содержания основного вещества в двух образцах препарата, изготовленных по разной технологии, получены метрологические характеристики средних результатов, приведенные в таблице 9.6. Требуется решить, является ли первый образец по данному показателю лучшим по сравнении со вторым образцом.

Поскольку $F = \frac{s_2^2}{s_1^2} = \frac{0,31}{0,25} = 1,24 < F(99\%,5,7) = 7,46$, то согласно неравенству 3.3 статистически достоверное различие величин s_1^2 и s_2^2 отсутствует.

Таблица 9.6

№ об-разца	n	n	$\bar{x}$ %	s	$s_{\bar{x}}$	P_2 (%)	$t(P_2,n)$	D_x	$D_{\bar{x}}$	$\bar{e}$ (%)
0	1	2	3	5	6	7	8	9	10	11
1	8	7	99,10	0,50	0,18	95	2,36	1,18	0,42	0,42
2	6	5	98,33	0,56	0,23	95	2,57	1,44	0,59	0,60

Следовательно, гипотеза $\bar{x}_1 = \bar{x}_2$ (5.1) проверяется с помощью уравнений (2.1), (2.2), (5.2) и (5.3).

$$s = \frac{\sum_{k=1}^{g}\left[(n_k - 1)\times s_k^2\right]}{\sum_{k=1}^{g}(n_k - 1)} = \frac{n_1 s_1^2 + n_2 s_2^2}{n_1 + n_2} = \frac{7\times 0,25 + 5\times 0.31}{7+5} = 0,275$$

$$s = \sqrt{s^2} = \sqrt{0,275} = 0,524$$

$$s_P^2 = \frac{s^2\times(n_1+n_2)}{n_1\times n_2} = \frac{0,275\times(8+6)}{8\times 6} = 0,0802$$

$$S_P = \sqrt{S_P^2} = \sqrt{0,0802} = 0,283$$

$$n = n_1 + n_2 - 2 = 8 + 6 - 2 = 12$$

$$t = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{S_P} = \frac{|99,10 - 98,33|}{0,283} = 2,72$$

$$t = 2,72 > t(95\%;12) = 2,18$$

$$t = 2,72 < t(99\%;12) = 3,08$$

Следовательно, с доверительной вероятностью P_2 = 95% гипотеза $\bar{x}_1 = \bar{x}_2$ может быть принята (т.е. первый образец лучше второго по содержанию основного вещества). Однако с доверительной вероятностью P_2 = 99% принять эту гипотезу нельзя из-за недостатка информации.

Если гипотеза $\bar{x}_1 = \bar{x}_2$ принята, то определяют доверительный интервал разности генеральных средних $\hat{x}_1 - \hat{x}_2$ (уравнение 5.10):

$$|\bar{x}_1 - \bar{x}_2| - t(P_2, n) \times s_P \le |\hat{x}_1 - \hat{x}_2| \le |\bar{x}_1 - \bar{x}_2| + t(P_2, n) \times s_P$$

(P_2 = 95%; n = 12);

$$|99{,}10 - 98{,}33| - 2{,}18 \times 0{,}283 \le |\hat{x}_1 - \hat{x}_2| \le |99{,}10 - 98{,}33| + 2{,}18 \times 0{,}283$$

$$0{,}15 \le |\hat{x}_1 - \hat{x}_2| \le 1{,}39$$

9.7. Оценка качества продукции.

Рассмотрим данные таблицы 9.6, относящиеся к выборке 1, как метрологическую характеристику используемого метрологически аттестованной методики анализа.

а) Пусть a_{min} = 98%, a_{max} = 100,50%. Тогда для испытуемого образца продукта средний результат анализа $\bar{A}$ при проведении трех параллельных определений (m=3) должен находиться в пределах:

$$a_{min} + \frac{U(P_1) \times s}{\sqrt{m}} < A < a_{max} - \frac{U(P_1) \times s}{\sqrt{m}}$$

При $P_1 = 99\%$:

$$98 + \frac{2{,}33 \times 0{,}464}{\sqrt{3}} < A < 100{,}5 - \frac{2{,}33 \times 0{,}464}{\sqrt{3}}; \qquad 98{,}62 < A < 99{,}88$$

При $P_1 = 95\%$:

$$98 + \frac{1{,}65 \times 0{,}464}{\sqrt{3}} < A < 100{,}5 - \frac{1{,}65 \times 0{,}464}{\sqrt{3}}; \qquad 98{,}44 < A < 100{,}06$$

б) Реальный средний результат анализа образца испытуемого продукта A=99% (при m=3). Тогда определение пределов a_{min} и a_{max}, гарантированно характеризующих качество данного образца с заданной доверительной вероятностью P_1, проводим, исходя из уравнения (6.6) или (6.7), полагая $A_{min} = A_{max} = A$.

$$a_{min} = A - \frac{U(P_1) \times s}{\sqrt{m}}$$

$$a_{max} = A + \frac{U(P_1) \times s}{\sqrt{m}}$$

При $P_1 = 99\%$:

$$a_{min} = 99 - \frac{2{,}33 \times 0{,}464}{\sqrt{3}} = 98{,}38\%$$

$$a_{max} = 99 + \frac{2{,}33 \times 0{,}464}{\sqrt{3}} = 99{,}62\%$$

При $P_1 = 95\%$:

$$a_{min} = 99 - \frac{1{,}65 \times 0{,}464}{\sqrt{3}} = 98{,}56\%$$

$$a_{max} = 99 + \frac{1{,}65 \times 0{,}464}{\sqrt{3}} = 99{,}64\%$$

Полученные оценки a_{min} и a_{max} близки к границам доверительного интервала

$$A \pm D_{\bar{x}} = A \pm \frac{D_x}{\sqrt{m}} = 99 \pm \frac{0{,}97}{\sqrt{3}} = 99 \pm 0{,}56\,.$$

9.8. Контроль содержания салициловой кислоты в салициловом спирте посредством секвенционального анализа.

Определение содержания салициловой кислоты (СК, М=138,12) в спирте салициловом 2% проводили путем титрования спиртовым раствором щелочи с молярной концентрацией 0,1000. Для титрования берутся пробы по 5 мл. На титрование идет *V* мл щелочи. Результаты титрования (*x* – найденное содержание СК в процентах к номинальному содержанию) двух различных образцов приведены ниже в таблице 9.8.

Таблица 9.8

	Образец 1				Образец 2			
№	*V* мл	*x* %	*x*-85	Σ(*x*-85)	*V* мл	*x* %	*x*-85	Σ(*x*-85)
1	6,71	92,68	7,68	7,68	6,40	88,26	3,26	3,26
2	7,20	99,45	14,45	22,12	6,40	88,40	3,40	6,66
3	7,08	97,79	12,79	34,91	6,20	85,77	0,77	7,43

Предварительные исследования показали, что s=0,5%. Допуски содержания салициловой кислоты *b* = 90% и *b'* = 110%.

Обычно принимают $a = b = 0{,}05$. Зададимся также различием генеральных средних $d_\mu = 2$.

Уравнения (8.7a) и (8.7b) дают:

$$a_0 = a_0' = \frac{s}{d_m} \times \ln \frac{b}{1 - \frac{a}{2}} = \frac{0{,}5}{2} \times \ln \frac{0{,}05}{1 - \frac{0{,}05}{2}} = 0{,}25 \times \ln 0{,}0513 = -0{,}25 \times 2{,}97 = -0{,}743$$

$$a_1 = a_1' = \frac{s}{d_m} \times \ln \frac{1-b}{\frac{a}{2}} = \frac{0{,}5}{2} \times \ln \frac{1-0{,}05}{\frac{0{,}05}{2}} = 0{,}25 \times \ln 38 = 0{,}25 \times 3{,}64 = 0{,}909$$

Для удобства представления на графике (чтобы накопительные суммы изменялись в нешироком диапазоне) вычтем из величин *b* и *b'* некоторую величину, например, 85%. Эту же величину вычтем и из каждого результата *x* (см. Таблицу).

Тогда уравнения (8.6a-8.6d) примут вид:

$$T_0 = -0{,}743 + 5 \times n\ .$$

$$T_1 = 0{,}909 + 5 \times n\ .$$

$$T_0' = -0{,}743 + 25 \times n\ .$$

$$T_1' = 0{,}909 + 25 \times n\ .$$

Данные уравнения образуют коридоры, показанные на Рис. 9.8. Накопительные суммы результатов титрований (см. Таблицу 9.8) показаны крестиками.

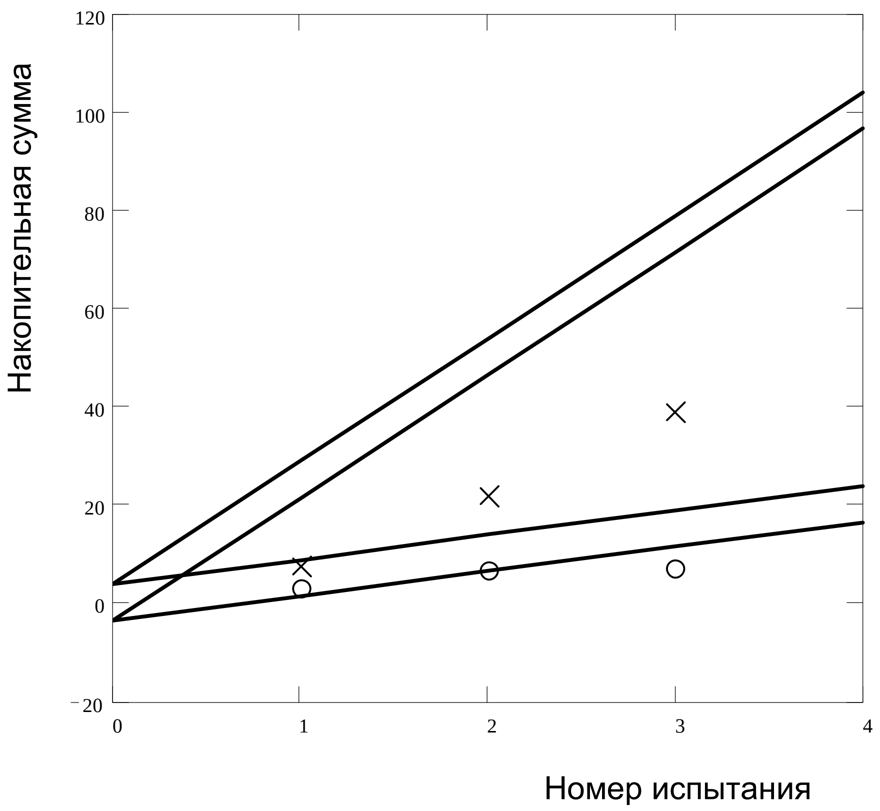


Рисунок 9.8. Результаты титрования салицилового спирта (2%) спиртовым раствором щелочи; крестиками показаны результаты для образца 1, кружками – для образца 2.

Для образца 1 первый результат попадает в нижний коридор, и испытания необ-

ходимо продолжить. Но уже второй результат попадает в область положительных решений, что дает основания заключить, что образец выдерживает испытание. Третье испытание в этом случае не требуется; соответствующий результат показан для большей наглядности рисунка. Первый результат для образца 2 (кружки) указывает на необходимость продолжить испытания; второй снова оказывается в той же области – у нижней границы. Третий результат попадает в область отрицательных решений – образец испытания не выдерживает.

10. РАСЧЕТ НЕОПРЕДЕЛЕННОСТИ ФУНКЦИИ НЕСКОЛЬКИХ СЛУЧАЙНЫХ ПЕРЕМЕННЫХ

Описанные в предыдущих главах расчеты доверительных интервалов результатов методик анализа применимы лишь в том случае, если измеряемая величина (концентрация, содержание и т.д.) является функцией только одной случайной переменной. Такая ситуация обычно возникает при использовании прямых методов анализа (титрование, определение сульфатной золы, тяжелых металлов и т.д.). Однако большинство методик количественного определения в фармакопейном анализе являются косвенными, т.е. используют стандартные образцы. Следовательно, измеряемая величина является функцией, как минимум, двух случайных переменных – аналитических сигналов (оптическая плотность, высота или площадь пика и т.д.) испытуемого и стандартного образцов. Кроме того, нередко возникает проблема прогнозирования неопределенности аналитической методики, состоящей из нескольких стадий (взвешивание, разбавление, конечная аналитическая операция), каждая из которых является по отношению к другой случайной величиной.

Таким образом, возникает общая проблема оценка неопределенности косвенно измеряемой величины, зависящей от нескольких измеряемых величин, в частности, как рассчитывать неопределенность всей аналитической методики, если известны неопределенности отдельных ее составляющих (стадий)?

Если измеряемая на опыте величина y является функцией n независимых случайных величин x_i , т.е.

$$y = f(x_1, x_2, \dots x_n) \qquad (10.1)$$

и число степеней свободы величин $\boldsymbol{x_i}$ одинаковы или достаточно велики (> 30, чтобы можно было применять статистику Гаусса, а не Стьюдента), то дисперсия величины $\boldsymbol{y}$ связана с дисперсиями величин $\boldsymbol{x_i}$ соотношением (правило распространения неопределенностей):

$$s_y^2 = \sum_{i=1}^{n} \left(\frac{\partial f}{\partial x_i} \right)^2 \times s_{xi}^2 \qquad (10.2)$$

Однако на практике степени свободы величин x_i обычно невелики и не равны друг другу. Кроме того, обычно интерес представляют не сами дисперсии (стандартные отклонения), а доверительные интервалы, рассчитать которые, используя уравнение (9.2), при небольших и неодинаковых степенях свободы невозможно. Поэтому для расчета неопределенности величины y (Δ_y) предложены различные подходы, среди которых можно выделить два основных: – линейная модель и подход Уэлча-Сатертуэйта (Welch-Satterthwaite).

10.1. Линейная модель

Если случайные переменные x_i статистически независимы, то доверительный интервал функции Δ_y связан с доверительными интервалами переменных Δ_{xi} соотношением (доверительные интервалы берутся для одной и той же вероятности):

$$D_y^2 = \sum_{i=1}^{n} \left(\frac{\partial f}{\partial x_i} \right)^2 \times D_{xi}^2 \qquad (10.3)$$

Данное соотношение является обобщением соотношения (10.2).

В фармакопейном анализе измеряемая величина y представляет собой обычно произведение или частное случайных и постоянных величин (масс навесок, разбавлений, оптических плотностей или площадей пиков и т.д.), т.е. (K- некая константа):

$$y = \frac{K \times x_1 \times x_2 \times ... x_m}{x_{m+1} \times x_{m+2} \times ... x_n} \qquad (10.4)$$

В этом случае соотношение (10.2) принимает вид:

$$D_{y,r}^2 = \sum_{i=1}^{n} D_{xi,r}^2 \qquad (10.5)$$

где использованы относительные доверительные интервалы.

Соотношение (10.5) применимо при любых (разных) степенях свободы (в том числе и бесконечных) для величин x_i. Его преимуществом является простота и наглядность. Использование абсолютных доверительных интервалов приводит к гораздо более громоздким выражениям, поэтому рекомендуется использовать относительные величины.

При проведении фармакопейного анализа в суммарной неопределенности ($\Delta_{As,r}$) анализа обычно всегда можно выделить такие типы неопределенностей: неопределенность пробоподготовки ($\Delta_{SP,r}$), неопределенность конечной аналитической операции ($\Delta_{FAO,r}$) и неопределенность аттестации стандартного образца ($\Delta_{RS,r}$). Величина $\Delta_{RS,r}$ обычно столь мала, что ею можно пренебречь. Учитывая это, а также то, что анализ проводится и для испытуемого раствора (индекс «smp»), и для раствора сравнения (индекс “*st*”), выражение (9.5) можно представить в виде:

$$D_{As,r} = \sqrt{[(D_{SP,r}^{smp})^2 + (D_{SP,r}^{st})^2] + [(D_{FAO,r}^{smp})^2 + (D_{FAO,r}^{st})^2]} \qquad (10.6)$$

При этом каждое из слагаемых рассчитывается из входящих в него компонентов по формуле (10.5).

В том случае, когда число степеней свободы величин x_i одинаковы или достаточно велики (> 30), выражение (10.5) дает:

$$s_{y,r}^2 = \sum_{i=1}^{n} s_{xi,r}^2 \qquad (10.7)$$

Это же соотношение получается при тех же условиях и из выражения (10.2).

10.1.1. Взвешенное среднее

Следует отметить, что в рамках линейной модели (10.3) можно получить взвешенное среднее нескольких неравноточных выборок разных генеральных совокупностей, используя в качестве весов квадраты соответствующих доверительных интервалов. Если имеются g выборочных средних $\bar{x}_k$ разных генеральных совокупностей, по-

лученных с неопределенностями $D_{\bar{x},k}$, то среднее этих выборок $\bar{x}$ определяется из соотношения:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{k=1}^{g}(1/D_{\bar{x},k}^{2})\times\bar{x}_k}{\sum_{k=1}^{g}(1/D_{\bar{x},k}^{2})} \qquad (10.8)$$

Абсолютный доверительный интервал $D_{\bar{x}}$ этой взвешенной средней определяется из соотношения:

$$D_{\bar{x}}^{2} = \frac{1}{\sum_{k=1}^{g}(1/D_{\bar{x},k}^{2})}\,. \qquad (10.8a)$$

В том случае, когда число степеней свободы выборочных средних $\bar{x}_k$ одинаковы или достаточно велики (> 30), выражение (10.8) дает:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{k=1}^{g}(1/s_{x,k}^{2})\times\bar{x}_k}{\sum_{k=1}^{g}(1/s_{x,k}^{2})} \qquad (10.9)$$

$$s_{\bar{x}}^{2} = \frac{1}{\sum_{k=1}^{g}(1/s_{x,k}^{2})} \qquad (10.9a)$$

Здесь $s_{x,k}^{2}$ - дисперсия единичного результата *k*-ой выборки. Отметим, что частный случай (10.9) гораздо менее применим, чем общее соотношение (10.8).

Выборочные средние $\bar{x}_k$ обычно близки между собой и к взвешенному среднему $\bar{x}$, поэтому в соотношениях (10.8) и (10.8а) вместо абсолютных доверительных интервалов могут быть использованы относительные доверительные интервалы, а в соотношениях (10.9) и (10.9а) вместо абсолютных дисперсий – относительные дисперсии.

В том случае, когда выборки представляют собой, например, результаты анализа одного и того же вещества в разных лабораториях, иногда возникает необходимость оценить среднюю неопределенность анализа этого вещества по всем лабораториям. В этом случае не совсем корректно каким-либо образом усреднять доверительные интервалы $D_{\bar{x},k}$, поскольку они зависят от числа анализов и теоретически могут быть сделаны как угодно малыми увеличением числа опытов. Более корректно оценивать межвыборочное относительное стандартное отклонение. Для этого могут быть использованы соотношения (2.1b) и (2.2). Следует отметить, что в этом случае полученное межвыборочное относительное стандартное отклонение не является оценкой некоего «генерального стандартного отклонения», а представляет собой просто некоторую среднюю величину.

10.2. Подход Уэлча-Сатертуэйта

В этом подходе дисперсию величины *y* (s_{y}^{2}) рассчитывают по соотношению

(10.2), не обращая внимания на различие в степенях свободы (ν_i) величин x_i . Для полученной дисперсии s_y^2 рассчитывают некое «эффективное» число степеней свободы n_{eff} (которое обычно является дробным), на основе которого затем по таблицам для заданной вероятности находят интерполяцией коэффициент Стьюдента. На основе его далее рассчитывают обычным путем доверительный интервал величины y (Δ_y) .

$$\nu_{eff} = \frac{s_y^4}{\sum_{i=1}^{n} \frac{\left(\frac{\partial f}{\partial x_i}\right)^4 \times s_{xi}^4}{\nu_i}}. \qquad (10.10)$$

В фармакопейном анализе для определяемой величины **y** обычно выполняется уравнение (10.4). В этом случае в подходе Уэлча-Сатертуэйта соотношение (10.2) переходит в выражение (10.7), и соотношение (10.10) принимает более простой вид:

$$\nu_{eff} = \frac{s_{y,r}^4}{\sum_{i=1}^{n} \frac{s_{xi,r}^4}{\nu_i}}. \qquad (10.11)$$

Здесь величина $s_{y,r}^4$ рассчитывается из соотношения (10.7).

Подход Уэлча-Сатертуэйта обычно дает более узкие доверительные интервалы, чем линейная модель. Однако он гораздо сложнее в применении и не позволяет выделить так просто неопределенности разных этапов (с последующими рекомендациями по их минимизации), как линейная модель в форме выражения (9.6).

При прогнозе неопределенности анализа используются генеральные величины (с бесконечным числом степеней свободы). В этом случае подход Уэлча-Сатертуэйта совпадает с линейной моделью.

10.3. Примеры расчетов неопределенности функции нескольких переменных

10.3.1. Расчет неопределенности ВЭЖХ-анализа готового лекарственного средства

В таблетке со средней массой 0,50 г содержится 0,050 г вещества А. В процессе проведения количественного определения методом ВЭЖХ брали навеску m = 0,5052 г порошка растертых таблеток в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводили растворителем до метки. Параллельно готовили раствор сравнения: 0,0508 г стандартного образца помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводили объем раствора растворителем до метки. Попеременно хроматографировали испытуемый раствор и раствор сравнения, получая по 5 хроматограмм. Ниже представлены площади полученных пиков:

Таблица 10.3.1

	Площади пиков (S и S_{st}) для хроматограммы №				
	1	2	3	4	5
Испытуемый р-р	13957605	13806804	13924245	13715195	14059478
Раствор сравнения	14240777	14102192	14316388	14205217	14409585

10.3.1.1. Конечная аналитическая операция

Рассчитаем средние значения, содержание вещества А в одной таблетке и относительные стандартные отклонения площадей пиков для испытуемого раствора и раствора сравнения в конечной аналитической операции.

а) Средние значения площадей пиков:

Испытуемый раствор:
(13957605 + 13806804 + 13924245 + 13715195 + 14059478)/5 = 13892665.
Раствор сравнения:
(14240777 + 14102192 + 14316388 + 14205217 + 14409585)/5 = 14254832.

b) Содержание анализируемого вещества *A*, в граммах, в пересчете на среднюю массу таблетки:

$$A = \frac{S \times m \times 50 \times 0,5}{S^{st} \times m_{st} \times 50} = \frac{13892665 \times 0,0508 \times 50}{14254832 \times 0,5052 \times 50} \times 0,5 = 0,0490$$

c) Относительные стандартные отклонения площадей пиков:

Испытуемый раствор:

$$RSD = \frac{100}{13846665} \times \sqrt{\frac{(13957605 - 13892665)^2 + (13806804 - 13892665)^2 + \\ + (13924245 - 13892665)^2 + (13874245 - 13715195)^2 + (13759478 - 14059478)^2}{5}} =$$
$= 0,97\%.$

Аналогично для *раствора сравнения*:

$$RSD^{st} = 0,81\%.$$

10.3.1.2. Суммарная неопределенность пробоподготовки $\Delta_{SP,r}$.

Согласно общей статье «Валидация аналитических методик и испытаний», неопределенности не должны превышать:
- мерной колбы вместимостью 50 мл – не более 0,17%;
- неопределенность взвешивания на аналитических весах - не более 0,2 мг (0,0002 г), что составляет:

- $\frac{100 \times 0,0002}{0,5052} = 0,04\%$ для испытуемого образца;
- $\frac{100 \times 0,0002}{0,0508} = 0,39\%$ для стандартного образца.

Данные неопределенности можно считать доверительными интервалами для вероятности 95%.

Суммарная неопределенность пробоподготовки рассчитывается по формуле (10.5):

$$D_{SP,r} = \sqrt{(0{,}04^2 + 0{,}39^2) + (0{,}17^2 + 0{,}17^2)} = 0{,}46\%$$

Отметим, что такой расчет является корректным для обоих подходов – линейной модели и подхода Уэлча-Сатертуэйта: поскольку число степеней свободы для каждого члена здесь бесконечно, то используется статистика Гаусса.

10.3.1.3. Расчет суммарной неопределенности анализа $\Delta_{As,r}$

Данный расчет различается для линейной модели и подхода Уэлча-Сатертуэйта.

а) Линейная модель

Общий случай. Рассчитаем неопределенности конечной аналитической операции $\Delta_{FAO,r}$ для испытуемого раствора и раствора сравнения. При расчете доверительных интервалов используем односторонний коэффициент Стьюдента для вероятности 95% (= 90% для двустороннего распределения), который для числа степеней свободы 5 - 1 = 4 равен 2.13. Доверительные интервалы рассчитываются для среднего из 5 результатов, поэтому в знаменателе стоит $\sqrt{5}$:

$$D^{smp}_{FAO,r} = \frac{1}{\sqrt{5}} \times t(90\%,4) \times RSD = \frac{1}{\sqrt{5}} \times 2{,}13 \times 0{,}97 = 0{,}92\%$$

$$D^{st}_{FAO,r} = \frac{1}{\sqrt{5}} \times t(90\%,4) \times RSD_{st} = \frac{1}{\sqrt{5}} \times 2{,}13 \times 0{,}81 = 0{,}77\%$$

Суммарная неопределенность конечной аналитической операции:

$$D_{FAO,r} = \sqrt{(D^{smp}_{FAO})^2 + (D^{st}_{FAO})^2} = \sqrt{(0{,}92)^2 + (0{,}77)^2} = 1{,}20\%$$

Используя уравнение (10.6), рассчитаем суммарную неопределенность анализа $D_{As,r}$:

$$D_{As,r} = \sqrt{0{,}46^2 + 1{,}20^2} = 1{,}29\%$$

Использование объединенного стандартного отклонения

Суммарную неопределенность анализа можно уменьшить за счет использования объединенного стандартного отклонения для конечной аналитической операции. Для этого надо учесть, что RSD и RSD_{st} являются выборочными величинами одной и той же генеральной совокупности.

Проверим вначале по Фишеру (см. раздел 2.1) гипотезу о равенстве дисперсий:

$$\frac{RSD^2}{RSD^2_{st}} = \frac{0{,}97^2}{0{,}81^2} = 1{,}434 < 6{,}388 = F(P_1 = 95\%;4;4)$$

Как видно, расчетное значение отношения дисперсий гораздо ниже табличного значения F-критерия на 95% уровне значимости. Поэтому можно принять гипотезу о

равенстве дисперсий и использовать формулы раздела 2 для объединения выборок.

Рассчитаем объединенное стандартное отклонение по уравнению (2.1b) :

$$RSD_{tot} = \sqrt{[(0,97)^2 + (0,81)^2]/2} = 0,89\%$$

Согласно (2.2), RSD_{tot} имеет число степеней свободы $2 \times (5-1) = 8$. Коэффициент Стьюдента для данного числа степеней свободы и односторонней вероятности 0,95 равен 1,86.

Тогда доверительные интервалы результатов конечной аналитической операции для испытуемого и стандартного растворов будут равны:

$$D_{FAO,r}^{smp} = D_{FAO,r}^{st} = \frac{1}{\sqrt{5}} \times t(90\%,8) \times RSD = \frac{1}{\sqrt{5}} \times 1,86 \times 0,89 = 0,74\%$$

Суммарная неопределенность конечной аналитической операции равна:

$$D_{FAO,r} = \sqrt{(D_{FAO}^{smp})^2 + (D_{FAO}^{st})^2} = \sqrt{(0,74)^2 + (0,74)^2} = 1,05\%$$

Используя уравнение (9.6), рассчитаем суммарную неопределенность анализа $D_{As,r}$:

$$D_{As,r} = \sqrt{0,46^2 + 1,05^2} = 1,15\%$$

Как видно, данная величина меньше полученной для обычного случая (1,29%).

в) Подход Уэлча-Сатертуэйта

Найдем стандартное отклонение пробоподготовки из доверительного интервала $\Delta_{SP,r}$ = 0,83%, используя коэффициент Гаусса 1,65 для односторонней вероятности 0,95 (поскольку число степеней свободы бесконечно – как для генеральной совокупности):

$s_{SP,r}$ = 0,39/1,65 =0,24%.

Из соотношения (9.5) найдем стандартное отклонение всей аналитической методики (RSD^2 и $(RSD^{st})^2$ делим на 5 как для дисперсий среднего результата):

$$s_{As,r} = \sqrt{s_{SP,r}^2 + \frac{1}{5}[RSD^2 + (RSD^{st})^2]} = \sqrt{0,24^2 + \frac{1}{5} \times (0,97^2 + 0,81^2)} = 0,61$$

Найдем эффективное число степеней свободы n_{eff}. При этом для RSD и RSD^{st} число степеней свободы равно 5-1 = 4, а для $s_{SP,r}$ - бесконечность.

$$v_{eff} = \frac{s_{As,r}^4}{\frac{s_{Sp,r}^4}{\infty} + \frac{RSD^4}{5^2 \times 4} + \frac{(RSD^{st})^4}{5^2 \times 4}} = \frac{0,61^4}{0 + \frac{1}{100} \times (0,97^4 + 0,81^4)} = 10,5$$

По Таблице 11.2 находим коэффициент Стьюдента для числа степеней свободы 10,5 и односторонней вероятности 0,95. Это 1,81 (интерполяция). Тогда доверительный

интервал всей аналитической методики будет:

$$D_{As,r} = 1,77 \times 0,61 = 1,10\%$$

Как видно, доверительный интервал получается меньше, чем для линейной модели (1,29% или 1,15%).

10.3.2. Прогноз неопределенности спектрофотометрического анализа готового лекарственного средства

При таких прогнозах всегда используются генеральные величины, поэтому применяется статистика Гаусса. Обычно используется коэффициент Гаусса 1,65 для односторонней вероятности 0,95.

При проведении спектрофотометрического количественного определения готового лекарственного средства берутся номинальные навески около m = 0,50 г (ГЛС) и m_{st} = 0,050 г (стандартный образец). Используются одинаковые разбавления для испытуемого раствора и раствора сравнения: навеска → 50 мл (мерная колба); 1 мл (пипетка) полученного раствора → 100 мл (мерная колба). Спектрофотометрическая неопределенность оптической плотности (по паспорту прибора) $s_{A,r}$ = 0,2%, кюветная неопределенность (экспериментально найдена) $s_{cell,r}$ = 0,1%. Предполагается, что будет проводиться 3-кратное измерение оптической плотности испытуемого раствора и раствора сравнения с вынимaнием кюветы. Необходимо провести прогноз неопределенности анализа.

1) Вначале найдем неопределенность пробоподготовки. Согласно общей статье «Валидация аналитических методик и испытаний», неопределенность не должны превышать:

- неопределенность взвешивания на аналитических весах - не более 0,2 мг (0,0002 г), что составляет 100*0,0002/0,5 = 0,04% для испытуемого образца и 100*0,0002/0,050 = 0,40% для стандартного образца;
- мерная колбы вместимостью 50 мл – 0,17%;
- мерная колба вместимостью 100 мл – 0,12%;
- пипетка вместимость 1 мл – 0,6%.

Полная неопределенность пробоподготовки составляет (учитывая испытуемый раствор и раствор сравнения):

$$D_{SP,r} = \sqrt{(0,04^2 + 0,04^2) + (0,40^2 + 0,40^2) + (0,17^2 + 0,17^2) + (0,12^2 + 0,12^2) + (0,6^2 + 0,6^2)} = 1,06\%$$

Отсюда, кстати, видно, что основной вклад в неопределенность пробоподготовки вносит пипетка малого объема (0,6%) и маленькая навеска 0,05 г (0,4%).

2) Найдем неопределенность конечной аналитической операции (спектрофотометрии). Коэффициент 2 учитывает наличие испытуемого раствора и раствора сравнения:

$$D_{FAO,r} = 1,65 \times \sqrt{\frac{2 \times (s_{A,r}^2 + s_{cell,r}^2)}{3}} = 1,65 \times \sqrt{\frac{2 \times (0,2^2 + 0,1^2)}{3}} = 0,30\%$$

3) Найдем теперь по формуле (10.6) полную прогнозируемую неопределенность анализа:

$$D_{As,r} = \sqrt{1,060^2 + 0,30^2} = 1,10\%$$

Как видно, основной вклад в полную неопределенность анализа вносит пробоподготовка (1,06%).

10.3.3. Расчет среднего значения нескольких неравноточных выборок

В результате межлабораторного эксперимента получены следующие результаты количественного анализа некоторого готового лекарственного средства:

№ лаборатории	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
$\bar{x}_k$ % абс	10,8	10,6	11,2	11,1	10,9	11,1	10,5	10,8	11,0	11,2
$D_{\bar{x},k}$ % абс.	0,32	0,21	0,65	0,45	0,25	0,32	0,19	0,34	0,42	0,58

Какое среднее значение содержания можно приписать лекарственному средству по данным межлабораторного эксперимента?

Результаты анализа в разных лабораториях нельзя считать выборками из одной генеральной совокупности, даже если они получены с использованием одного метода, например, ВЭЖХ. Это связано с тем, что точностные характеристики приборов в разных лабораториях разные. В частности, хроматографы могут обладать существенно разными генеральными дисперсиями сходимости хроматографического сигнала, связанными как с приборными факторами, так и с различием колонок и условий анализа. Поэтому уравнение (2.3) здесь не применимо. Не применимо и уравнение (10.9) – число опытов, как правило, невелико и не одинаково. Поэтому применим соотношение (10.8):

$$\bar{x} = \frac{\frac{10,8}{0,32^2}+\frac{10,6}{0,21^2}+\frac{11,2}{0,65^2}+\frac{11,1}{0,45^2}+\frac{10,9}{0,25^2}+\frac{11,1}{0,32^2}+\frac{10,5}{0,19^2}+\frac{10,8}{0,34^2}+\frac{11,0}{0,42^2}+\frac{11,2}{0,58^2}}{\frac{1}{0,32^2}+\frac{1}{0,21^2}+\frac{1}{0,65^2}+\frac{1}{0,45^2}+\frac{1}{0,25^2}+\frac{1}{0,32^2}+\frac{1}{0,19^2}+\frac{1}{0,34^2}+\frac{1}{0,42^2}+\frac{1}{0,58^2}} =$$

$$= \frac{1189,89}{110,51} = 10,77\%$$

Для сравнения - обычное (не взвешенное) среднее значение по формуле (1.2) будет 11,92%, т.е. на 100*(11,92-10,77)/10,77 = 1,4% выше.

В соответствии с соотношением (9.8а), абсолютный доверительный интервал этого взвешенного среднего равен:

$$D_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{1}{110,51}} = 0,095\%$$

Как видно, эта величина существенно меньше любого частного доверительного интервала $D_{\bar{x},k}$.

11. Приложения[9]

Таблица 11.1

Числовые значения контрольного критерия $Q(P_1, n)$

n	Q		
	P = 90%	*P* = 95%	*P* = 99%
3	0,89	0,94	0,99
4	0,68	0,77	0,89
5	0,56	0,64	0,76
6	0,48	0,56	0,70
7	0,43	0,51	0,64
8	0,40	0,48	0,58
9	0,38	0,46	0,55

Таблица 11.2

Числовые значения коэффициента Стьюдента $t(P, n)$

	Вероятность P_1 или P_2					
$P_1 \rightarrow$	95%	97,5%	99%	99,5%	99,9%	99,95%
$P_2 \rightarrow$	90%	95%	98%	99%	99,8%	99,9%
Число степеней свободы n	Значения $t(P, n)$					
1	6,3138	12,7062	31,8205	63,6567	318,31	636,619
2	2,9200	4,3027	6,9646	9,9248	22,3271	31,5991
3	2,3534	3,1824	4,5407	5,8409	10,2145	12,9240
4	2,1318	2,7764	3,7469	4,6041	7,1732	8,6103
5	2,0150	2,5706	3,3649	4,0321	5,8934	6,8688
6	1,9432	2,4469	3,1427	3,7074	5,2076	5,9588
7	1,8946	2,3646	2,9980	3,4995	4,7853	5,4079
8	1,8595	2,3060	2,8965	3,5554	4,5008	5,0413
9	1,8331	2,2622	2,8214	3,2498	4,2968	4,7809
10	1,8125	2,2281	2,7638	3,1693	4,1437	5,5869
11	1,7956	2,2010	2,7181	3,1058	4,0247	4,4370
12	1,7823	2,1788	2,6810	3,0545	3,9296	4,3178
13	1,7709	2,1604	2,6503	3,0123	3,8520	4,2208
14	1,7613	2,1448	2,6245	2,9768	3,7874	4,1405
15	1,7530	2,1314	2,6025	2,9467	3,7328	4,0728
16	1,7459	2,1199	2,5835	2,9208	3,6862	4,0150
17	1,7396	2,1098	2,5669	2,8982	3,6458	3,9651
18	1,7341	2,1009	2,5524	2,8784	3,6105	3,9216
19	1,7291	2,0930	2,5395	2,8609	3,5794	3,8834
20	1,7247	2,0860	2,5280	2,8453	3,5518	3,8495

[9] Л.Н. Большев, Н.В. Смирнов. Таблицы математической статистики. М.: Наука. 1983. – 415 с.

21	1,7207	2,0796	2,5176	2,8314	3,5272	3,8193
22	1,7171	2,0739	2,5083	2,8188	3,5050	3,7921
23	1,7139	2,0687	2,4999	2,8073	3,4850	3,7676
24	1,7109	2,0639	2,4922	2,7969	3,4668	3,7454
25	1,7081	2,0595	2,4851	2,7874	3,4502	3,7251
26	1,7056	2,0555	2,4786	2,7787	3,4350	3,7066
27	1,7033	2,0518	2,4727	2,7707	3,4210	3,6896
28	1,7011	2,0484	2,4671	2,7633	3,4082	3,6739
29	1,6991	2,0452	2,4620	2,7564	3,3962	3,6594
30	1,6973	2,0423	2,4573	2,7500	3,3852	3,6460
40	1,6839	2,0211	2,4233	2,7045	3,3069	3,5510
50	1,6759	2,0086	2,4033	2,6778	3,2614	3,4960
100	1,6602	1,9840	2,3642	2,6259	3,1737	3,3905
∞	1,6479	1,9647	2,3338	2,5857	3,1066	3,3101

P_1 - вероятность нахождения истинного значения величины (m) в интервале $\overline{x} - D_X \le m \le \infty$ или $-\infty \le m \le \overline{x} + D_X$ (одностороннее распределение);

P_2 – вероятность нахождения истинного значения величины (m) в интервале $\overline{x} - D_X \le m \le \overline{x} + D_X$ (двустороннее распределение);

Таблица 11.3.

Процентные точки распределения c^2(P_1, n)

n	P_1 = 95%	P_1 =99%
1	3,841	6,635
2	5,991	9,210
3	7,815	11,345
4	9,488	13,277
5	11,070	15,086
6	12,592	16,812
7	14,067	18,475
8	15,507	20,090
9	16,919	21,666
10	18,307	23,209

n	P_1 = 95%	P_1 = 99%
11	19,675	24,725
12	21,026	26,217
13	22,362	27,688
14	23,685	29,141
15	24,996	30,578
16	26,296	32,000
20	31,410	37,566
25	37,652	44,314
30	43,773	50,892
40	55,758	63,691

P_1 - вероятность того, что оцениваемое значение c^2 не превышает табличное. Это оцениваемое значение рассматривается как значимое (P_1 = 95%) или высоко значимое (P_1 = 99%).

Таблица 11.4

Критерий Кокрена. Критические точки статистики $G = \frac{s_{max}^2}{\sum_{k=1}^{g} s_k^2}$ **, построенной по *g* независимым оценкам дисперсии (s_k^2), каждая из которых обладает *v* степенями свободы.**

v → / *g* ↓	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	16	36	∞
							G(P = 95%)						
2	0,9985	0,9750	0,9392	0,9057	0,8772	0,8534	0,8332	0,8159	0,8010	0,7880	0,7341	0,6602	0,5000
3	0,9669	0,8709	0,7977	0,7457	0,7071	0,6771	0,6530	0,6333	0,6167	0,6025	0,5466	0,4748	0,3333
4	0,9065	0,7679	0,6841	0,6287	0,5895	0,5598	0,5365	0,5175	0,5017	0,4884	0,4366	0,3720	0,2500
5	0,8412	0,6838	0,5981	0,5440	0,5063	0,4783	0,4564	0,4387	0,4241	0,4118	0,3645	0,3066	0,2000
6	0,7808	0,6161	0,5321	0,4803	0,4447	0,4184	0,3980	0,3817	0,3682	0,3568	0,3135	0,2612	0,1667
7	0,7271	0,5612	0,4800	0,4307	0,3974	0,3726	0,3535	0,3384	0,3259	0,3154	0,2756	0,2278	0,1429
8	0,6798	0,5157	0,4377	0,3910	0,3595	0,3362	0,3185	0,3043	0,2926	0,2829	0,2462	0,2022	0,1250
9	0,6385	0,4775	0,4027	0,3584	0,3286	0,3067	0,2901	0,2768	0,2659	0,2568	0,2226	0,1820	0,1111
10	0,6020	0,4450	0,3733	0,3311	0,3029	0,2823	0,2666	0,2541	0,2439	0,2353	0,2032	0,1655	0,1000
12	0,5410	0,3924	0,3264	0,2880	0,2624	0,2439	0,2299	0,2187	0,2098	0,2020	0,1737	0,1403	0,0833
15	0,4709	0,3346	0,2758	0,2419	0,2195	0,2034	0,1911	0,1815	0,1736	0,1671	0,1429	0,1144	0,0667
20	0,3894	0,2705	0,2205	0,1921	0,1735	0,1602	0,1501	0,1422	0,1357	0,1303	0,1108	0,0879	0,0500
24	0,3434	0,2354	0,1907	0,1656	0,1493	0,1374	0,1286	0,1216	0,1160	0,1113	0,0912	0,0743	0,0417
30	0,2929	0,1980	0,1593	0,1377	0,1237	0,1137	0,1061	0,1002	0,0958	0,0921	0,0771	0,0604	0,0333
40	0,2370	0,1576	0,1259	0,1082	0,0968	0,0887	0,0827	0,0780	0,0745	0,0713	0,0595	0,0462	0,0250
60	0,1737	0,1131	0,0895	0,0765	0,0682	0,0623	0,0583	0,0552	0,0520	0,0497	0,0411	0,0316	0,0167
∞	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

v → / *k* ↓	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	16	36	∞
							G(P = 99%)						
2	0,9999	0,9950	0,9794	0,9586	0,9373	0,9172	0,8988	0,8823	0,8674	0,8539	0,7949	0,7067	0,5000
3	0,9933	0,9423	0,8831	0,8335	0,7933	0,7606	0,7335	0,7107	0,6912	0,6743	0,6059	0,5153	0,3333
4	0,9676	0,8643	0,7814	0,7212	0,6761	0,6410	0,6129	0,5897	0,5702	0,5536	0,4884	0,4057	0,2500
5	0,9279	0,7885	0,6957	0,6329	0,5875	0,5531	0,5259	0,5037	0,4854	0,4697	0,4094	0,3351	0,2000
6	0,8828	0,7218	0,6258	0,5635	0,5195	0,4866	0,4608	0,4401	0,4229	0,4081	0,3529	0,2858	0,1667
7	0,8376	0,6644	0,5685	0,5080	0,4659	0,4347	0,4105	0,3911	0,3751	0,3616	0,3105	0,2494	0,1429
8	0,7945	0,6152	0,5209	0,4627	0,4226	0,3932	0,3704	0,3522	0,3373	0,3248	0,2779	0,2214	0,1250
9	0,7544	0,5727	0,4810	0,4251	0,3870	0,3592	0,3378	0,3207	0,3067	0,2950	0,2514	0,1992	0,1111
10	0,7175	0,5358	0,4469	0,3934	0,3572	0,3308	0,3106	0,2945	0,2813	0,2704	0,2297	0,1811	0,1000
12	0,6528	0,4751	0,3919	0,3428	0,3099	0,2861	0,2680	0,2535	0,2419	0,2320	0,1961	0,1535	0,0833
15	0,5747	0,4069	0,3317	0,2882	0,2593	0,2386	0,2228	0,2104	0,2002	0,1918	0,1612	0,1251	0,0667
20	0,4799	0,3297	0,2654	0,2288	0,2048	0,1877	0,1748	0,1646	0,1567	0,1501	0,1248	0,0960	0,0500
24	0,4247	0,2871	0,2295	0,1970	0,1759	0,1608	0,1495	0,1406	0,1338	0,1283	0,1060	0,0810	0,0417
30	0,3632	0,2412	0,1913	0,1635	0,1454	0,1327	0,1232	0,1157	0,1100	0,1054	0,0867	0,0658	0,0333
40	0,2940	0,1915	0,1508	0,1281	0,1135	0,1033	0,0957	0,0898	0,0853	0,0816	0,0668	0,0503	0,0250
60	0,2151	0,1371	0,1069	0,0902	0,0796	0,0721	0,0668	0,0625	0,0594	0,0567	0,0461	0,0344	0,0167
∞	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

$s_{max}^2 = max(s_k^2)$; ***P*** – вероятность того, что все g оценок дисперсии являются выборочными значениями одной и той же генеральной совокупности. Гипотеза равенства дисперсий может быть значимой (***P*** = 95%**)** или высоко значимой (***P*****=**99%**).**

Таблица 11.5.

Процентные точки распределения Фишера (*F* (P_1, n_1, n_2)– распределения)

P_1 - вероятность того, что оцениваемое значение ***F*** не превышает табличное. Это оцениваемое значение рассматривается как значимое (P_1 = 95%) или высоко значимое (P_1 = 99%).

ν_1 → ν_2↓	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20	24	30	¥
								P_1 = 95%								
1	161,5	199,5	215,7	224,6	230,2	234,0	236,8	238,9	240,5	241,9	243,9	246,0	248,0	249,1	250,1	254,3
2	18,51	19,00	19,16	19,25	19,30	19,33	19,35	19,37	19,39	19,4	19,41	19,43	19,45	19,45	19,46	19,50
3	10,13	9,552	9,277	9,117	9,014	8,941	8,887	8,845	8,812	8,786	8,745	8,703	8,660	8,639	8,617	8,527
4	7,709	6,944	6,591	6,388	6,256	6,163	6,094	6,041	5,999	5,964	5,912	5,858	5,803	5,774	5,746	5,628
5	6,608	5,786	5,410	5,192	5,050	4,950	4,876	4,818	4,773	4,735	4,678	4,619	4,558	4,527	4,496	4,365
6	5,987	5,143	4,757	4,534	4,387	4,284	4,207	4,147	4,099	4,060	4,000	3,938	3,874	3,842	3,808	3,669
7	5,591	4,737	4,347	4,120	3,972	3,866	3,787	3,726	3,677	3,637	3,575	3,511	3,445	3,411	3,376	3,230
8	5,318	4,459	4,066	3,838	3,688	3,581	3,501	3,438	3,388	3,347	3,284	3,218	3,150	3,115	3,079	2,928
9	5,117	4,257	3,827	3,633	3,482	3,374	3,293	3,230	3,179	3,137	3,073	3,006	2,937	2,901	2,864	2,707
10	4,965	4,103	3,708	3,478	3,326	3,217	3,136	3,072	3,020	2,978	2,913	2,845	2,774	2,737	2,700	2,538
12	4,747	3,885	3,490	3,259	3,106	2,996	2,913	2,849	2,796	2,753	2,687	2,617	2,544	2,506	2,466	2,296
15	4,543	3,682	3,287	3,056	2,901	2,790	2,707	2,641	2,588	2,544	2,475	2,403	2,328	2,288	2,247	2,066
20	4,351	3,493	3,098	2,866	2,711	2,599	2,514	2,447	2,393	2,348	2,278	2,203	2,124	2,083	2,039	1,843
25	4,242	3,385	2,991	2,759	2,603	2,490	2,405	2,337	2,282	2,236	2,165	2,089	2,007	1,964	1,919	1,711
30	4,171	3,316	2,922	2,690	2,534	2,421	2,334	2,266	2,211	2,165	2,092	2,015	1,932	1,887	1,841	1,622
50	4,034	3,183	2,790	2,557	2,400	2,286	2,208	2,130	2,082	2,026	1,952	1,871	1,784	1,747	1,697	1,438
¥	3,841	2,996	2,605	2,372	2,214	2,099	2,010	1,938	1,880	1,831	1,752	1,666	1,571	1,517	1,459	1,000
ν_1 → ν_2↓	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20	24	30	¥
								P_1 = 99%								
1	4052	5000	5403	5625	5764	5859	5928	5981	6023	6056	6106	6157	6209	6235	6261	6366
2	98,50	99,00	99,17	99,25	99,30	99,33	99,36	99,37	99,39	99,40	99,42	99,43	99,45	99,46	99,47	99,50
3	34,12	30,82	29,46	28,71	28,24	27,91	27,67	27,49	27,35	27,23	27,05	26,87	26,69	26,60	26,51	26,13
4	21,20	18,00	16,69	15,98	15,52	15,21	14,98	14,80	14,66	14,55	14,37	14,20	14,02	13,93	13,84	13,46
5	16,26	13,27	12,06	11,39	10,97	10,67	10,46	10,29	10,16	10,05	9,888	9,722	9,553	9,467	9,379	9,020
6	13,75	10,93	9,780	9,148	8,746	8,466	8,260	8,102	7,976	7,874	7,718	7,559	7,396	7,313	7,229	6,880
7	12,25	9,547	8,451	7,847	7,460	7,191	6,993	6,840	6,719	6,620	6,469	6,314	6,155	6,074	5,992	5,650
8	11,26	8,649	7,591	7,006	6,632	6,371	6,178	6,029	5,911	5,814	5,667	5,515	5,359	5,279	5,198	4,859
9	10,56	8,022	6,992	6,422	6,057	5,802	5,613	5,467	5,351	5,257	5,111	4,962	4,808	4,729	4,649	4,311
10	10,04	7,559	6,552	5,994	5,636	5,386	5,200	5,057	4,942	4,849	4,706	4,558	4,405	4,327	4,247	3,909
12	9,330	6,927	5,953	5,412	5,064	4,821	4,640	4,499	4,388	4,296	4,155	4,010	3,858	3,781	3,701	3,361
15	8,683	6,359	5,417	4,893	4,556	4,318	4,142	4,004	3,895	3,805	3,666	3,522	3,372	3,294	3,214	2,868
20	8,096	5,849	4,938	4,431	4,103	3,871	3,699	3,564	3,457	3,368	3,231	3,088	2,938	2,859	2,779	2,421
25	7,770	5,568	4,675	4,177	3,855	3,627	3,457	3,324	3,217	3,129	2,993	2,850	2,699	2,620	2,538	2,169
30	7,562	5,390	4,510	4,018	3,699	3,473	3,305	3,173	3,067	2,979	2,843	2,700	2,549	2,469	2,386	2,006
50	7,171	5,057	4,199	3,720	3,408	3,186	3,038	2,890	2,803	2,698	2,536	2,419	2,265	2,202	2,116	1,683
¥	6,635	4,605	3,782	3,319	3,017	2,802	2,639	2,511	2,407	2,321	2,185	2,039	1,878	1,791	1,696	1,000

Таблица 11.6

Процентные точки выборочного коэффициента корреляции *r*

***P*₁** – вероятность того, что $r < R$ или $-R < r$ (односторонний критерий),

P_2 – вероятность того, что коэффициент корреляциий r находится в интервале $-R < r < R$ (двусторонний критерий)

Выборочный коэффициент корреляции ***r*** значимо (с надежностью P_1 или P_2) отличается от нуля, если его абсолютная величина $|r|$ превышает табличное значение $R(P, n)$

	Вероятность P_1 или P_2					
$P_1 \rightarrow$	95%	97.5%	99%	99.5%	99.75%	99.95%
$P_2 \rightarrow$	90%	95%	98%	99%	99.5%	99.9%
Число степеней свободы n	Значения $R(P,n)$					
1	0,9877	0,99692	0,999507	0,999877	0,999969	0,999999
2	0,900	0,9500	0,9800	0,99000	0,99500	0,999000
3	0,805	0,878	0,9343	0,9587	0,9740	0,99114
4	0,729	0,811	0,882	0,9172	0,9417	0,9741
5	0,669	0,754	0,833	0,875	0,9056	0,9509
6	0,621	0,707	0,789	0,834	0,870	0,9249
7	0,582	0,666	0,750	0,798	0,836	0,898
8	0,549	0,632	0,715	0,765	0,805	0,872
9	0,521	0,602	0,685	0,735	0,776	0,847
10	0,497	0,576	0,658	0,708	0,750	0,823
11	0,476	0,553	0,634	0,684	0,726	0,801
12	0,457	0,532	0,612	0,661	0,703	0,780
13	0,441	0,514	0,592	0,641	0,683	0,760
14	0,426	0,497	0,574	0,623	0,664	0,742
15	0,412	0,482	0,558	0,606	0,647	0,725
16	0,400	0,468	0,543	0,590	0,631	0,708
17	0,389	0,456	0,529	0,575	0,616	0,693
18	0,378	0,444	0,516	0,561	0,602	0,679
19	0,369	0,433	0,503	0,549	0,589	0,665
20	0,360	0,423	0,492	0,537	0,576	0,652
25	0,323	0,381	0,445	0,487	0,524	0,597
30	0,296	0,349	0,409	0,449	0,484	0,554
35	0,275	0,325	0,381	0,418	0,452	0,519
40	0,257	0,304	0,358	0,393	0,425	0,490
45	0,243	0,288	0,338	0,372	0,403	0,465
50	0,231	0,273	0,322	0,354	0,384	0,443
60	0,211	0,250	0,295	0,325	0,352	0,408
70	0,195	0,232	0,274	0,302	0,327	0,380
80	0,183	0,217	0,257	0,283	0,307	0,357
90	0,173	0,205	0,242	0,267	0,290	0,338
100	0,164	0,195	0,230	0,254	0,276	0,321

#5.3.3. ВАЛИДАЦИЯ АНАЛИТИЧЕСКИХ МЕТОДИК ИСПЫТАНИЙ

В статье описываются процедуры, применяемые для валидации методик и испытаний (Испытание – это аналитическая методика, описанная в частной статье, в совокупности с требованиями к получаемым по ней результатам. Результатом проведения испытания является ответ на вопрос, соответствует или нет данное лекарственное средство требованиям частной статьи), включаемых в общую статью Государственной Фармакопеи Республики Беларусь и аналитическую нормативную документацию на лекарственные средства и вспомогательные вещества (частные статьи). Поскольку в частные статьи включаются различные инструментальные и не инструментальные испытания (определение подлинности, контроль примесей, количественное определение и др.), требования к валидации испытания зависят от его типа и применяемого аналитического метода.

А. ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ ВАЛИДАЦИИ АНАЛИТИЧЕСКИХ МЕТОДИК

1. Введение

Валидация аналитической методики — это экспериментальное доказательство того, что методика пригодна для решения предполагаемых задач.

В данном разделе рассматриваются характеристики аналитических методик (испытаний), подлежащие валидации (далее «валидационные характеристики»).

Валидационные характеристики методик, применяемые для целей идентификации, контроля примесей и количественного определения, приведены в Табл. 1.

Таблица 1

Валидационные характеристики, рассматриваемые для различных испытаний и методик

	Типы аналитических методик			
Характеристики	Идентификация	Испытания на примеси		Количественное оп-
		Количественные	Предельные	Растворение, определение только содержания, активности
Правильность	-	+	-	+
Точность: Сходимость Внутрилабораторная точность		+ +*	-	+ + *
Специфичность **	+	+	+	+
Предел обнаружения	-	. * * *	+	-
Предел количественного определения	-	+	-	-
Линейность	-	+	-	+
Диапазон применения	-	+	-	+

«-« — характеристика обычно не исследуется;

«+» - характеристика обычно исследуется;

«*» — в тех случаях, когда проводится исследование воспроизводимости, исследование внутрилабораторной точности не требуется;

«**» — недостаток специфичности испытания можно компенсировать другим (другими) дополнительным испытанием (см. п. 4.2);
«***»- может потребоваться в некоторых случаях (например, когда предел определения и нормируемый предел содержания определяемой примеси близки).

2. Аналитические испытания и методики, подлежащие валидации

В статье рассматривается проведение валидации для таких испытаний:
- испытаний на идентификацию;
- количественных испытаний для определения примесей;
- испытания на предельное содержание примесей;
- количественных испытаний для определения действующего вещества и других компонентов (например, консервантов) в лекарственных субстанциях и готовых лекарственных средствах.

Все аналитические методики и испытания, входящие в общие статьи Фармакопеи и аналитическую нормативную документацию, должны быть валидированы. Однако для валидации некоторых испытаний, например, таких как «Растворение» или «Определение размера частиц», могут потребоваться другие валидационные процедуры, не описанные в общей статье.

КРАТКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИСПЫТАНИЙ

Испытания на идентификацию предназначены для подтверждения наличия анализируемого вещества в образце. Обычно это достигается путем сравнения каких-либо свойств (например, спектральных характеристик, хроматографического поведения, химической реакционной способности и т.д.) испытуемого и стандартного образцов.

Испытания, предназначенные для контроля примесей могут быть как количественными, так и предельными. Назначение обоих испытаний — характеризовать чистоту образца. Для валидации количественных и предельных испытаний необходимы различные валидационные характеристики.

Количественное определение предназначено для определения анализируемого вещества в образце. Такая же валидационная процедура может быть применена к методике количественного определения, связанной с другим испытанием (например, в испытании «Растворение»).

3. Валидационные характеристики и требования

Набор исследуемых валидационных характеристик зависит от назначения аналитической методики. Типичные валидационные характеристики:
— правильность;
— точность;
— сходимость;
— внутрилабораторная точность;
— специфичность;
— предел обнаружения;
— предел количественного определения;
— линейность;
— диапазон применения.

Этот список следует рассматривать как типовой для указанных испытаний (аналитических методик). Как правило, на стадии разработки методики изучается также валидационная характеристика «робастность».

Повторное проведение валидации может потребоваться в следующих случаях:
—изменение в синтезе лекарственной субстанции;
—изменение в составе готового лекарственного средства;
—изменения в аналитической методике.

Объем проведения повторной валидации определяется спецификой изменений. Повторная валидация может требоваться и в иных случаях.

4. Словарь

Аналитическая методика (analytical procedure) —это способ проведения анализа, т.е. детальное изложение всех операций, необходимых для выполнения испытания. Она включает в себя описание подготовки испытуемых образцов, стандартов, реактивов; описание используемого оборудования с указанием параметров; условия получения калибровочных кривых; использование расчетных формул и т.д.

Специфичность (specificity) — способность однозначно оценивать анализируемое вещество в присутствии других компонентов, которые могут присутствовать в образце. Это могут быть примеси, продукты разложения, вспомогательные вещества и т.д.

Недостаток специфичности испытания может быть компенсирован другим (другими) дополнительным испытанием.

Специфичность для различных типов испытаний означает следующее:

Идентификация — доказательство того, что идентифицировано именно анализируемое вещество.

Испытания на примеси — доказательство того, что каждое испытание на примеси позволяет однозначно характеризовать содержание примесей в образце (например, испытания «Сопутствующие примеси», «Тяжелые металлы», «Содержание остаточных количеств органических растворителей» и др.)

Количественное определение (содержание или активность) — доказательство того, что методика позволяет точно и правильно установить содержание или активность именно анализируемого вещества в образце.

Правильность (accuracy, trueness) характеризует степень соответствия между известным истинным значением или справочной величиной и значением, полученным поданной методике.

Точность (precision) аналитической методики выражает степень близости (или степень разброса) результатов для серии измерений, выполненных по данной методике на различных пробах одного и того же однородного образца. Точность может рассматриваться на трех уровнях: сходимость, внутрилабораторная точность и воспроизводимость.

Точность необходимо изучать на достоверно однородных образцах. Однако, если однородный образец получить невозможно, то можно использовать его раствор или модельные смеси.

Точность аналитической методики обычно характеризуют отклонением, стандартным отклонением или относительным стандартным отклонением для серии измерений.

Сходимость (repeatability) характеризует точность методики при ее выполнении в одних и тех же условиях (в частности, одним и тем же аналитиком или группой аналитиков) в течение небольшого промежутка времени.

Внутрилабораторная точность (intermediateprecision) характеризует влияние внутрилабораторных вариаций: различные дни, различные аналитики, различное оборудование и т.п. изменения.

Воспроизводимость (reproducibility) характеризует точность в межлабораторном эксперименте.

Предел обнаружения для конкретной аналитической методики представляет собой минимальное количество анализируемого вещества вобразце, которое может быть обнаружено (при этом не обязательно должно быть определено точное значение).

Предел количественного определения для аналитической методики представляет собой минимальное количество анализируемого вещества в образце, которое может быть количественно определено с требуемой правильностью и точностью. Предел количественного определения является валидационной характеристикой методик количественного определения малых концентраций веществ в образце и рассматривается в основном при определении примесей и/или продуктов разложения.

Линейность (linearity) — это способность методики (в пределах диапазона применения) давать величины, прямо пропорциональные концентрации (количеству) анализируемого вещества в образце.

Диапазоном применения (range) аналитической методики является интервал между минимальной и максимальной концентрациями (количествами) анализируемого вещества в образце (включая эти концентрации), для которого показано, что аналитическая методика имеет требуемую точность, правильность и линейность.

Робастность (robustness) - это способность аналитической методики не подвергаться влиянию малых, задаваемых (контролируемых) аналитиком изменений в условиях выполнения методики. Робастность является показателем надежности методики при ее использовании в указанных условиях.

B. ПРОВЕДЕНИЕ ВАЛИДАЦИИ АНАЛИТИЧЕСКИХ МЕТОДИК

1. Введение

Главной задачей валидации аналитической методики является экспериментальное доказательство того, что данная методика пригодна для достижения тех целей, для которых она предназначена. В отчет по валидации должны быть включены все данные, полученные в процессе валидации, и использованные для расчетов формулы с соответствующим их обсуждением.

Подходы к проведению валидации методик анализа биологических и биотехнологических препаратов могут быть иными, чем указано в данной статье.

При проведении валидации необходимо использовать только стандартные образцы с известными характеристиками, подтвержденными документально. Необходимая степень их чистоты зависит от задач, которые решаются при их использовании.

Последовательность рассмотрения валидационных характеристик отражает процесс, по которому может разрабатываться и валидироваться аналитическая

методика. Однако целесообразно планировать эксперимент так, чтобы соответствующие валидационные характеристики изучались одновременно, например: специфичность, линейность, диапазон применения, правильность и точность.

2. Специфичность

Исследование специфичности проводится при валидации испытаний на идентификацию, контроль примесей и количественное определение. Способ подтверждения специфичности зависит от задач, для решения которых предназначена аналитическая методика.

В тех случаях, когда методика недостаточно специфична, применяют сочетание двух или более аналитических методик для достижения необходимого уровня избирательности.

2.1. Идентификация. Испытания на идентификацию должны обеспечивать возможность различать соединения близкого строения, которые могут присутствовать в образце совместно с определяемым компонентом. Избирательность методики может быть подтверждена получением положительных результатов (возможно, путем сравнения с известным стандартным образцом) для образцов, содержащих определяемый компонент, и отрицательных результатов, полученных для образцов, не содержащих его. Для подтверждения отсутствия ложноположительных результатов испытание на идентификацию может быть проверено для веществ с близким строением, или сопутствующих анализируемому веществу. Выбор потенциально мешающих проведению испытания веществ должен быть обоснован.

2.2. Количественное определение и испытания на примеси. При валидации хроматографических методик для подтверждения специфичности должны использоваться характерные хроматограммы с указанием индивидуальных веществ. Аналогичный подход используют и для других методов разделения.

Для хроматографических методик степень разделения должна быть исследована для соответствующих концентраций веществ. Для подтверждения специфичности может быть использована степень разделения двух наиболее близко элюирущихся веществ.

В случае использования неспецифичного метода количественного определения необходимо применять дополнительные аналитические методики и подтверждать специфичность всего комплекса методик. Например, если количественное определение проводится титриметрическим методом, то его можно дополнить соответствующим испытанием на примеси.

Для количественного определения и для испытаний на примеси применяют одинаковые подходы, описанные ниже.

2.2.1. Образцы примесей имеются. Для метода количественного определения необходимо подтвердить избирательность определения анализируемого вещества в присутствии примесей и/или других компонентов образца. Это можно сделать внесением в образец (субстанцию или лекарственное средство) примесей и/или других компонентов образца в соответствующей концентрации и последующего доказательства того, что это не отразилось на получаемом результате (путем сравнения результатов, полученных на исходном и загрязненном образцах).

Для испытаний на чистоту подтверждение избирательности проводят путем загрязнения субстанции или готового лекарственного средства соответствующи-

ми количествами примесей и доказательства разделения этих примесей как друг от друга, так и от других компонентов образца.

2.2.2. Образцы примесей отсутствуют. В случае, если образцы примесей или продуктов разложения отсутствуют, подтверждение специфичности проводят путем сравнения результатов анализа образцов, содержащих примеси или продукты разложения, предлагаемой методикой и другой арбитражной методикой. В качестве последней может быть использована фармакопейная методика или другая валидированная методика. Этот подход предполагает предварительное загрязнение образца продуктами разложения путем выдерживания его в стрессовых условиях: воздействие света, тепла, влажности, гидролиза, окисления и т.п.

При валидации количественного определения следует сравнить результаты анализов, полученных с использованием валидируемой и арбитражной методик.

При валидации испытания на чистоту следует сравнить результаты определения примесей, полученные с использованием валидируемой и арбитражной методик.

Для доказательства того, что пик анализируемого вещества соответствует только одному компоненту, используют тесты на чистоту пиков, например, с использованием диодноматричного детектирования, масс-спектрометрии и др.

3. Линейность

Линейная зависимость должна быть исследована в пределах диапазона применения аналитической методики. Она может быть подтверждена непосредственно на субстанции (путем разбавления исходного раствора) или, для лекарственных средств, на модельных смесях с использованием соответствующей процедуры.

По полученным данным строят график зависимости сигнала как функции концентрации или количества определяемого компонента и визуально оценивают его линейность. Если линейная зависимость наблюдается, то результаты обрабатывают подходящим статистическим методом, например, методом наименьших квадратов. В некоторых случаях для получения линейности данные следует подвергнуть предварительному математическому преобразованию. Должны быть определены и представлены: коэффициент корреляции, точка пересечения с осью ординат, тангенс угла наклона прямой и остаточная сумма квадратов отклонений, а также график со всеми экспериментальными данными. Для оценки линейности могут понадобиться отклонения экспериментальных данных от прямой.

Некоторые аналитические методики, например, иммуноаналитические, не показывают линейности ни при каких математических преобразованиях. В таких случаях аналитический отклик должен быть описан подходящей функцией концентрации анализируемого вещества в образце.

Для подтверждения линейности используют не менее пяти концентраций. Другие подходы должны быть обоснованы.

4. Диапазон применения

Диапазон применения методики зависит от ее предназначения и определяется при изучении линейности. В пределах диапазона применения методика должна обеспечивать требуемую линейность, правильность и точность.

Минимальные допустимые диапазоны применения методик:

- Для количественного определения лекарственных субстанций или лекарственных форм - от 80% до 120% от номинального содержания.

- Для однородности дозирования - от 70% до 130% от номинального содержания, если для испытания не требуется более широкий интервал (например, для дозированных аэрозолей).

- Для испытаний на растворение - ±20% (абсолютных) от нормируемой величины высвобождения. Например, если при контроле высвобождения пролонгированных лекарственных средств нормируемая величина высвобождения составляет от 20% за первый час и до 90% за 24 ч, то диапазон применения должен быть от О% до 110% от номинального содержания.

- Для определения примесей - от концентрации, в которой примесь обычно обнаруживается, до120% от нормируемого содержания.

Для примесей, обладающих чрезвычайно сильным действием или имеющих токсический или непредсказуемый фармакологический эффект, предел детектирования/количественного определения должен соответствовать тому уровню концентрации, на котором эти примеси должны контролироваться.

Примечание: при проведении валидации испытания на примеси непосредственно в процессе разработки методики необходимо определить диапазон применения, внутри которого находится предполагаемый предел нормирования примесей.

В случае, если количественное определение и испытание на примеси выполняются совместно, как одно испытание и используется только стандарт основного вещества, соответствующий его номинальному содержанию, то диапазон применения должен охватывать диапазон концентрации от нормируемого содержания примеси до 120% от номинального содержания основного вещества.

5. Правильность

Правильность изучают в пределах диапазона применения аналитической методики.

5.1. Количественное определение

5.1.1. Субстанции. Могут использоваться следующие способы определения правильности:

- применение аналитической методики к образцу с известной степенью чистоты, например, к стандартному образцу;
- сравнение результатов анализа, полученных с использованием валидируемой методики и арбитражного метода, правильность и точность которого известны (использование независимого метода, см. п. 2.2.);
- заключение о правильности можно сделать после того, как установлены точность, линейность и специфичность.

5.1.2. Готовые лекарственные средства. Могут использоваться следующие способы определения правильности:

—применение методики к искусственным смесям, к которым были добавлены известные количества анализируемого вещества;

—в случае, когда невозможно получить образцы всех компонентов лекарственного средства, возможно применение метода добавок или арбитражной методики, правильность которой доказана (см. п. 2.2.);

—заключение о правильности можно сделать после того, как установлены точность, линейность и специфичность.

5.2. Примеси (количественное содержание).

Правильность изучают на образцах (субстанции или готового лекарственного средства) с добавленным известным количеством примесей.

Если примеси или продукты разложения недоступны, применяют арбитражный метод (см. п. 2.2.). Если примеси неизвестны, то чувствительность их определения может быть принята равной чувствительности определения субстанции. В случае, если чувствительность определения субстанции и примеси существенно отличается, вводят коэффициент пересчета.

Должен быть указан конкретный способ нормирования содержания примесей, например, в массовых процентах, в процентах по отношению к площади пика главного компонента или др.

5.3. Представление данных. Правильность оценивают не менее чем для девяти определений для трех различных концентраций, охватывающих весь диапазон применения, т.е. три концентрации и три определения для каждой концентрации. Определения должны включать все стадии методики.

Правильность выражают в процентах найденного значения от введенного или как разность между средним и истинным значением с учетом соответствующих доверительных интервалов.

6. Точность. Валидационная характеристика «точность» изучается для методик количественного определения.

6.1. Сходимость. Сходимость изучают, выполняя:

— не менее девяти определений, охватывающих диапазон применения методики (три концентрации/три повтора) или

— не менее шести определений для образцов с содержанием анализируемого вещества, близким к номинальному.

6.2. Внутрилабораторная точность. Установливают влияние случайных факторов на точность валидируемой аналитической методики. Типичными исследуемыми факторами являются различные дни, различные аналитики, различное оборудование и т.п. При изучении влияния различных факторов предпочтительно использовать планирование эксперимента.

6.3. Воспроизводимость. Воспроизводимость оценивают путем проведения межлабораторных исследований. Воспроизводимость должна быть изучена при включении методики в Фармакопею.

6.4. Представление данных. При изучении точности должны представляться: стандартное отклонение, относительное стандартное отклонение и доверительный интервал.

7. Предел обнаружения

В зависимости от того, является ли методика инструментальной или не инструментальной, возможны различные подходы для определения предела обнаружения. Используются следующие подходы.

7.1. Визуальная оценка. Визуальную оценку используют как для не инструментальных, так и для инструментальных методов.

Предел обнаружения устанавливают путем анализа образцов с известными концентрациями анализируемого вещества и оценкой минимального содержания, при котором анализируемое вещество надежно определяется.

7.2. Соотношение Сигнал/Шум. Этот подход применим только к тем методам, для которых наблюдается шум базовой линии. Для определения соотношения сигнал/шум сравнивают величины сигналов, полученные для контрольного опыта и для образцов с низкими концентрациями анализируемого вещества. На основании полученных данных устанавливают минимальную концентрацию, для которой величина отношения сигнал/шум составляет обычно от трех до двух.

7.3. Использование калибровочной прямой и стандартного отклонения аналитического сигнала. Предел обнаружения (ПО) может быть выражен как:

$$MB = 3{,}3 \times \frac{d}{S} \qquad (1)$$

где:
δ - стандартное отклонение сигнала,
S - тангенс угла наклона калибровочной прямой.

Значение тангенса угла наклона калибровочной прямой вычисляют из калибровочной прямой для анализируемого вещества. Оценка стандартного отклонения сигнала может быть проведена многими способами, например следующими.

7.3.1. Использование стандартного отклонения сигнала для контрольного опыта. Измеряют величину аналитического сигнала для необходимого числа образцов, не содержащих анализируемое вещество, и вычисляют стандартное отклонение.

7.3.2. Использование калибровочной прямой. Получают калибровочную прямую для образцов с содержанием анализируемого вещества, близким к пределу обнаружения, и вычисляют ее параметры. В качестве стандартного отклонения S в формуле (1) может быть использовано стандартное отклонение свободного члена линейной зависимости.

7.4. Представление данных. Представляют значение предела обнаружения с указанием способа, использованного для его определения. Если определение предела обнаружения основывается на отношении сигнал/шум, представляют соответствующие хроматограммs/

Если значение предела обнаружения получено путем вычислений или экстраполяции, его оценка должна быть подтверждена анализом необходимого числа образцов с содержанием анализируемого вещества, близким к пределу обнаружения.

8. Предел количественного определения

Возможно несколько подходов для определения предела количественного определения, зависящих от того, является ли методика инструментальной или не инструментальной. Могут быть использованы следующие подходы.

8.1. Визуальная оценка. Визуальную оценку используют как для не инструментальных, так и для инструментальных методов.

Предел количественного определения устанавливают путем анализа образцов с известными концентрациями анализируемого вещества и оценкой минимального содержания, при котором анализируемое вещество определяется количественно с требуемой правильностью и точностью.

8.2. Соотношение Сигнал/Шум. Этот подход применим только к тем методам, для которых наблюдается шум базовой линии (см. 7.2.). Для определения соотно-

шения сигнал/шум сравнивают величины сигналов, полученные для холостого опыта и для образцов с низкими концентрациями анализируемого вещества. На основании полученных данных устанавливают минимальную концентрацию, для которой величина отношения сигнал/шум составляет около 10:1.

8.3. Использование калибровочной прямой и стандартного отклонения сигнала

$$MB = 10 \times \frac{d}{S} \qquad (2)$$

где:
δ - стандартное отклонение сигнала,
S - тангенс угла наклона калибровочной прямой.

Значение тангенса угла наклона калибровочной прямой может быть определено из калибровочной прямой для анализируемого вещества. Оценка стандартного отклонения сигнала может быть проведена многими способами, например, следующими.

8.3.1. Использование стандартного отклонения сигнала для контрольного опыта. Измеряют величину аналитического сигнала для необходимого числа образцов, не содержащих анализируемое вещество, и вычисляют стандартное отклонение.

8.3.2. Использования калибровочной прямой. Получают калибровочную прямую для образцов с содержанием анализируемого вещества, близким к пределу обнаружения, и вычисляют ее параметры. В качестве стандартного отклонения δ в формуле (2) может быть использовано стандартное отклонение свободного члена линейной зависимости.

8.4. Представление данных. Представляют значение предела обнаружения с указанием способа, использованного для его определения. Значение предела определения должно быть подтверждено анализом необходимого числа образцов с содержанием анализируемого вещества, близким к пределу обнаружения.

9. Робастность

Оценку робастности проводят на стадии разработки методики с учетом типа изучаемой методики. Эта оценка должна доказать надежность результатов анализа при небольших изменениях параметров методики.

Если на результаты анализа влияют условия его проведения, то эти условия должны быть стандартизированы, и в текст методики вносят соответствующие предостережения.

Типичные примеры изучаемых параметров:
— устойчивость во времени аналитических растворов;
— время экстракции.

В случае жидкостной хроматографии:
— pH подвижной фазы;
— состав подвижной фазы;
— колонки (различные серии и/или поставщики);
— температура;
— скорость подвижной фазы.

В случае газовой хроматографии:

— колонки (различные серии и/или поставщики);
— температура;
— скорость газа-носителя.

10. Проверка пригодности хроматографической системы

Проверка пригодности системы является составной частью многих аналитических методик. Этот тест основан на представлении о том, что оборудование, электроника, аналитические операции и анализируемые образцы составляют единую систему, которую можно исследовать как целое. Параметры, вводимые в тест «Проверка пригодности хроматографической системы», зависят от используемого метода анализа и обосновываются исследованиями по робастности.

С. ВАЛИДАЦИЯ АНАЛИТИЧЕСКИХ МЕТОДИК - ОСОБЕННОСТИ ЕЕ ПРИМЕНЕНИЯ К МЕТОДАМ, ИСПОЛЬЗУЕМЫМ В ФАРМАКОПЕЕ

1. Оптическое вращение *(2.2.7)*

1.1. Введение. Выбирают растворитель, позволяющий получать максимально возможный угол вращения. Исследуют стабильность угла вращения испытуемого раствора в течение не менее 2 ч. При необходимости указывают, что раствор используют свежеприготовленным. В необходимых случаях указывают время достижения стабильного значения угла вращения.

Там, где возможно, используют D-линию натрия.

1.2. Идентификация. Если испытуемое вещество представляет собой энантиомер, то для идентификации используют удельный показатель оптического вращения.

Если удельный показатель оптического вращения используют только для целей идентификации, то его значение можно не пересчитывать на сухое вещество. Регламентируемые пределы величины удельного показателя должны учитывать допустимые пределы количественного содержания анализируемого вещества и чистоту образцов различного происхождения, которые выдерживают требования соответствующей монографии.

Если удельный показатель оптического вращения используется также и для контроля чистоты энантиомеров, то испытание раздела «Идентификация» может содержать ссылку: выдерживает требования испытания «Удельное оптическое вращение».

1.3. Испытания. Удельный показатель оптического вращения (в отдельных случаях угол вращения) может быть использован для подтверждения оптической чистоты энантиомера. Этот метод менее чувствителен, чем метод жидкостной хроматографии (ЖХ). В случае, когда измерение удельного оптического вращения предназначено для того, чтобы нормировать содержание одного из энантиомеров, необходимо показать, что в условиях методики анализируемый энантиомер имеет достаточную величину оптического вращения, чтобы быть обнаруженным. Результат определения представляют в пересчете на сухое вещество. Там, где это возможно, представляют данные о влиянии потенциальных примесей. Пределы удельного показателя оптического вращения устанавливают с учетом возможного содержания примесей. При отсутствии информации об оптическом вращении примесей обычно устанавливают пределы отклонения ±5 % от среднего значения, полученного на образцах, отвечающих всем остальным требованиям частной ста-

тьи. Там, где это возможно, исследуют образцы различного происхождения. Полезно также исследовать образцы со сроками годности, близкими к предельному.

Измерение оптического вращения может использоваться для подтверждения того, что субстанция является рацематом. В таких случаях обычно устанавливают пределы от (- 0,10)^{o} до (+0,10)^{o}.

1.4. Количественное определение. Оптическое вращение может использоваться для количественного определения субстанции. При этом необходимо использовать стандартный образец с известной оптической чистотой.

2. Абсорбционная спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях спектра *(2.2.25)*

Должна быть доказана пригодность выбранных условий определения, таких как используемые растворители и их качество, pH раствора и т. д.

Обычно ультрафиолетовая спектрофотометрия имеет ограниченную специфичность, которую можно повысить использованием первой и второй производной спектра.

2.1. Идентификация. Ультрафиолетовая спектрофотометрия сама по себе редко используется для идентификации. Когда этот метод включают в набор испытаний для идентификации, необходимо изучить его специфичность путем сравнения спектров анализируемого вещества со спектрами подобных соединений. Специфичность метода можно повысить, если использовать не абсолютные значения оптических плотностей, а спектральные отношения.

2.2. Испытания на предельное содержание примесей. Если ультрафиолетовая спектрофотометрия используется в испытаниях на допустимые пределы содержания примесей, следует показать, что анализируемые примеси дают достаточный вклад в измеряемую оптическую плотность. При выбранной длине волны должна быть установлена оптическая плотность, соответствующая нормируемой концентрации анализируемой примеси.

2.3. Количественное определение. Если ультрафиолетовая спектрофотометрия используется для количественного определения, то следует оценить влияние примесей на светопоглощение. При количественном определении не рекомендуется использовать удельный показатель поглощения. Если удельный показатель поглощения все же применяется, то его значение следует устанавливать на основании межлабораторного исследования, используя серии с известной чистотой. Чистота этих образцов должна оцениваться с использованием различных методов, включающих как методы разделения, так и абсолютные методы (не требующие использования стандартного образца).

3. Неинструментальные испытания на чистоту и предельное содержание примесей

3.1. Внешний вид раствора *(2.2.1* и *2.2.2).* Это визуальные испытания, предназначенные для оценки общей чистоты субстанции и основанные на сравнении окраски (или опалесценции) испытуемого раствора и серии эталонов. Часто неизвестно, какие примеси и в какой концентрации обуславливают окраску или опалесценцию. В этом случае валидация основывается на сопоставлении данных, полученных для разных серий, представленных производителем (или производителя-

ми). Если примеси известны и доступны, валидацию этого метода проводят путем сравнения с более совершенным методом.

3.2. Кислотность и щелочность. Это неспецифичное испытание является одной из характеристик чистоты образца и используется для контроля протеолитических примесей.

3.2.1. *Выбор показателя «pH» или «Кислотность/щелочность» для контроля качества субстанций*. Для контроля протолитических примесей в субстанциях используют два испытания:

- полуколичественное титрование с использованием индикатора или потенциометрического определения точки титрования – испытание «Кислотность/щелочность»;

- измерение pH.

Если вещество имеет буферную емкость, преимущественным является измерение pH. В обратном случае рекомендуется титриметрическая методика. Испытание «Кислотность/щелочность» применяют тогда, если испытуемая субстанция не гидролизуется или нерастворима в воде.

Вопрос выбора испытания «Кислотность/щелочность» или «pH» при разработке аналитической нормативной документации или монографии на субстанцию может быть определен на подступе оценки буферных емкостей самой субстанции.

Для оценки буферных емкостей субстанции строят кривую потенциометрического титрования водного раствора (или, в случае нерастворимых в воде веществ, - экстракта (водной вытяжки)) необходимой концентрации (от 10 г/л до 50 г/л), используя в качестве титранта *0,01М раствор кислоты хлористоводородной* или *0,01М раствор натрия гидроксида*, соответственно. Точка изгиба на кривой титрования является настоящим pH раствора и для чистой субстанции находится на изгибе с пределом pH. Ступеней буферной емкости испытуемого раствора является величина суммарного сдвига pH (ΔpH), рассчитанная из кривой титрования в результате прибавления к 10 мл испытуемого раствора 0,25 мл *0,01М раствора натрия гидроксида*, а затем к другим 10 мл этого же раствора – 0,25 мл *0,01М раствора кислоты хлористоводородной*. Чем больше величина ΔpH, тем меньше буферная емкость раствора.

Величина ΔpH испытуемого раствора определяет выбор метода для регламентации протолитических примесей в соответствии с приведенной схемой (Табл.2). Классификация субстанций базируется на том, что для большинства индикаторов переход окраски происходит в пределах 2 единиц pH.

Таблица 2.

Классификация субстанций в соответствии с величиной ΔрН

Класс буферности	ΔрН	Название предлагаемого испытания
Класс A	ΔрН>4	Испытание «Кислотность/щелочность» с двумя соответствующими индикаторами
Класс B	4> ΔрН>2	Испытание «Кислотность/щелочность» с одним соответствующим индикатором
Класс C	2>ΔрН>0,2	Прямое измерение рН
Класс D	ΔрН<0,2	Протолитические примеси невозможно удовлетворительно контролировать. К таким субстанциям относятся вещества, которые являются солями и состоят из ионов с более чем одной кислотной и/или основной функциональными группами. Для их измерение рН может способствовать обеспечению обозначенного хранения субстанции, если пределы рН являются достаточно узкими.

Путем изменения концентрации испытуемого раствора можно изменить класс буферности, к которому попадает испытуемая субстанция и в соответствии со схемой, приведенной в Таблице 2. При этом будет изменяться и форма кривой титрования. При этом, если возможно, не следует выходить за пределы обозначенных выше концентраций. Однако, если вещество очень мало растворимо в воде, можно использовать раствор с концентрацией меньше 10-50 г/л.

В некоторых случаях испытание «Кислотность/щелочность» нельзя провести при помощи индикатора или через окрашивание самого индикатора, или через разложение самого вещества. В таком случае испытание проводят при помощи потенциометрического титрования. Если прибавление кислоты или щелочи вызывает равновесие молекулы субстанции, или выпадения осадка, следует, не обращая внимания на буферную емкость, отказаться от проведения испытания «Кислотность/щелочность» на предмет измерения рН.

Растворы готовят с использованием *воды, свободной от углерода диоксида, Р*.

3.3. Испытания на предельное содержание анионов и катионов *(2.4.)* Пригодность этих испытаний следует доказать путем использования метода добавок и/или сравнения с другими, более совершенными методами.

Сульфатная зола (2.4.14). Это испытание предназначено для определения суммы катионов металлов, присутствующих в органических субстанциях, но не подходит для неорганических солей органических соединений. Обычно предел не должен превышать 0.1%. Этот метод не требует валидации.

Тяжелые металлы (2.4.8). Применяют различные способы проведения этого испытания. Обычно предел содержания тяжелых металлов составляет 0,001%

(10 ppm) или 0,002% (20 ppm), но иногда и 0,0005% (5 ppm), что находится вблизи предела обнаружения.

Для валидации испытания на тяжелые металлы анализируют испытуемый образец и образец, специально загрязненный свинцом в соответствующей концентрации. Окраска испытуемого образца должна быть меньше, а загрязненного образца - равной или большей, чем окраска эталона.

Для ряда методик, требующих сжигания образца, существует опасность потерь некоторых тяжелых металлов (таких как, например, ртуть и свинец в присутствии хлоридов). В таких случаях, когда это в возможно, контролируют содержание тяжелых металлов методом атомно-абсорбционной спектрометрии или другим инструментальным методом.

Если известно, что при синтезе субстанции используется катализатор, например, палладий, никель или родий, то их содержание целесообразно контролировать колориметрическими или инструментальными методами (например, атомно-абсорбционная спектрометрия и др.).

Цветные реакции или реакции осаждения. Для отдельных катионов и анионов описаны предельные испытания, основанные на визуальном сравнении окраски или опалесценции. При этом необходимо доказать, что:

—окраска или опалесценция для нормируемых концентраций отчетливо видны;

—найденная концентрация добавленного иона одинакова как для испытуемого раствора, так и для раствора сравнения (как визуально, так и с помощью методов, основанных на измерении поглощения);

—значения оптической плотности растворов, содержащих 50%, 100% и 150% анализируемой примеси от нормируемой концентрации, должны значимо различаться;

—определение примеси на уровне нормируемой концентрации проводят не менее шести раз и вычисляют стандартное отклонение. Найденная концентрация должна составлять не менее 80% от введенной, а относительное стандартное отклонение - не более 20%.

Целесообразно провести сравнение результатов предельного испытания с результатами количественного определения с использованием независимого метода, например, атомно-абсорбционной спектрофотометрии для катионов или ионной хроматографии для анионов. Результаты, полученные двумя методами, должны быть близки.

4. Атомно-абсорбционная спектрометрия *(2.2.23)*

Метод атомно-абсорбционной спектрометрии (ААС) применяют для испытаний по определению содержания отдельных элементов, присутствующих в образце.

4.1. Специфичность. Специфичность данного метода определяется тем, что атомы анализируемого элемента поглощают характеристическое излучение от источника со строго дискретными длинами волн, соответствующими данному элементу. Однако возможны помехи вследствие как оптических, так и химических эффектов. Перед началом валидации необходимо выявить помехи такого рода и, если возможно, снизить их влияние путем использования соответствующих приемов.

Эти помехи могут привести к систематической погрешности при использовании метода прямой калибровки или к изменению чувствительности метода. Основ-

ным источником погрешности в методе ААС являются погрешности, связанные с процессом калибровки и мешающим влиянием матрицы.

4.2. Градуировка. Использование линейной модели градуировки описано в общей статье *2.2.23 «Атомно-абсорбционная спектрометрия».* Для доказательства применимости линейной регрессионной модели рекомендуется использовать не менее пяти градуировочных растворов. В некоторых случаях возможно использование параболической модели градуировки. При этом также используют не менее пяти градуировочных растворов. Рекомендуется использовать концентрации градуировочных растворов с равномерным распределением внутри диапазона применения.

Для каждой концентрации рекомендуется выполнять не менее пяти измерений.

Проблемы с калибровкой часто могут быть выявлены визуально. Однако градуировочные графики сами по себе нельзя использовать как доказательство пригодности метода калибровки. Калибровочный график представляют в следующем виде:

а) на графике откладывают измеренные оптические плотности как функции концентраций и строят кривую, описывающую эту градуировочную функцию, вместе с ее доверительными интервалами. Экспериментальные точки должны находиться в пределах доверительного интервала построенного графика.

б) на графике откладывают остаточные отклонения (разности между измеренными и вычисленными по градуировочному графику оптическими плотностями) как функции концентрации. Эти разности должны распределяться вокруг оси абсцисс случайным образом.

В некоторых случаях разброс значений сигнала возрастает с ростом концентрации, что может быть выявлено из графика остаточных отклонений или статистическими методами. При этом наибольшая точность может быть достигнута при использовании градуировки с весовыми множителями. Может быть применена как линейная, так и квадратичная весовая функция.

В случае использования весовой модели строится график взвешенных разностей (т.е. разностей, умноженных на веса) как функции концентрации следующим образом:

а) на графике откладывают измеренные оптические плотности как взвешенные функции концентраций и строят кривую, описывающую эту градуировочную функцию вместе с ее доверительными интервалами.

б) на графике откладывают взвешенные остаточные отклонения (т.е. взвешенные разности между измеренными и вычисленными по градуировочному графику оптическими плотностями) как функции концентрации.

Необходимо показать, что модель достаточно точно описывает экспериментальные данные.

4.3. Эффекты матрицы. Если для получения градуировочной функции используют метод градуировочного графика, то необходимо показать, что чувствительность для раствора анализируемого образца и градуировочных растворов одинакова.

Если применяется градуировка в виде прямой линии, различия в чувствительности могут быть обнаружены путем сравнения наклонов градуировочного графика, полученного с использованием эталонных растворов, и растворов, полученных внесением стандартной добавки к испытуемому раствору. Точность оценки наклонов обеих прямых зависит от числа и распределения точек измерения. По-

этому для построения обоих регрессионных линий рекомендуется использовать достаточное число точек (не менее пяти) и выбирать концентрации преимущественно на границах диапазона градуировки.

Обоснованием для возможности использования метода градуировочного графика является незначимость различий наклонов полученных прямых по критерию Стьюдента. Если различия значимы, то используют метод стандартных добавок.

4.4. Предел обнаружения и предел количественного определения (метод, основанный на стандартном отклонении контрольного опыта - см. 7.3.1 и 8.3.1, раздел В). Выполняют контрольные опыты, для которых предпочтительно использовать растворы «плацебо», содержащие все компоненты образца, за исключением определяемого. Если такие контрольные опыты выполнить невозможно, то допустимо использовать холостые растворы, содержащие все реагенты и приготовленные так же, как и испытуемый раствор.

5. Разделительные методы

5.1. Хроматографические методы. Различные хроматографические методы могут использоваться для идентификации, контроля примесей и количественного определения. Ниже описаны особенности валидации данных методов.

5.1.1. Тонкослойная хроматография *(2.2.27)*

Специфичность. Для тестов идентификации обычно нельзя добиться специфичности, используя только тонкослойную хроматографию (ТСХ) саму по себе, однако достаточная избирательность может быть достигнута при сочетании ТСХ с другими методами. Если для испытания на допустимые пределы примесей избирательность недостаточна, то используют дополнительное испытание (испытания) для контроля примеси (примесей), зона которой не была отделена от других зон. Необходимо доказать избирательность совокупности используемых методик. Для испытаний идентификации улучшение избирательности может быть достигнуто при использовании опрыскивания реактивом, который позволяет различать близкие соединения по цвету.

Стационарная фаза. Необходимо показать, что данное испытание пригодно для проведения анализа на пластинках одного типа, но различного происхождения.

Тест «Проверка пригодности хроматографической системы». Такой тест обычно проводится для подтверждения разделения двух близко элюирующихся соединений, одним из которых является анализируемое вещество. Необходимо доказать, что разделение выбранных соединений гарантирует пригодность системы для достижения поставленных целей.

Для испытаний на предельное содержание примесей необходимо учитывать следующее:

Обнаружение. Необходимо избегать использования особых опрыскивающих реагентов, если в методике не используется стандарт нормируемой примеси.

Предел обнаружения. Если используют количественную инструментальную методику, для определения предела обнаружения используют подходы, описанные в пункте 7 раздела В. Если используют визуальную методику, то необходимо

показать, что обнаруживается количество, соответствующее указываемому пределу обнаружения.

Коэффициент пересчета. Если примеси определяемы, то необходимо показать, что чувствительности определения примеси и основного вещества близки. Для испытаний на допустимые пределы примесей различия в чувствительностях могут быть показаны путем сравнения пределов обнаружения.

Предел количественного определения, линейность, диапазон и сходимость. Эти данные необходимо представлять при использовании инструментальной количественной ТСХ.

5.1.2. Жидкостная хроматография *(2.2.29)*

ИДЕНТИФИКАЦИЯ

Специфичность. Для тестов идентификации обычно нельзя добиться специфичности, используя только жидкостную хроматографию саму по себе, однако достаточная избирательность может быть достигнута при сочетании жидкостной хроматографии с другими методами. Необходимо представлять данные о времени удерживания, относительном времени удерживания или коэффициенте емкости для основного вещества и близких по строению веществ. Эти данные необходимо представлять для нескольких стационарных фаз одного типа.

ИСПЫТАНИЯ НА ПРЕДЕЛЬНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ПРИМЕСЕЙ

Специфичность. *Избирательность разделения.* Должно быть показано разделение известных и возможных примесей с основным веществом и, если возможно, между собой. Специфичность может быть подтверждена при использовании для детектирования масс-спектрометра. Примеси, которые не отделяются от основного вещества, должны контролироваться другим методом. Необходимо представлять данные о времени удерживания, относительном времени удерживания или коэффициенте емкости для основного вещества и примесей. Эти данные должны предоставляться для нескольких стационарных фаз одного типа.

Избирательность детектирующей системы. Выбор детектора и условий детектирования должен быть обоснован. Специфичность может быть подтверждена, например, при использовании для детектирования масс-спектрометра.

Коэффициент пересчета. Если примеси определяемы, то необходимо показать, что чувствительности определения примеси и основного вещества близки (при использовании УФ-детектирования - при выбранной длине волны детектирования; это необходимо показать и для других типов детекторов - например, рефрактометрического или кондуктометрического). Если отношение чувствительностей известной примеси и основного вещества выходит за пределы 0,8 - 1,2 и если допустимый предел содержания этой примеси больше 0,1%, то необходимо использовать коэффициент пересчета либо стандарт нормируемой примеси в варианте внешнего стандарта.

Предел обнаружения или количественного определения. Эти пределы должны определяться для метода внешнего стандарта при использовании разведений испытуемой субстанции или при использовании стандарта примеси. Если пик примеси выходит в непосредственной близости от пика субстанции (особенно если

непосредственно за ним), то предел обнаружения или количественного определения должен устанавливаться по этой примеси. Метод, описанный в пункте 7 раздела В, пригоден для вычисления обоих указанных пределов.

Стабильность. Необходимо представлять данные, подтверждающие срок годности испытуемого раствора и раствора сравнения. Также должны представляться данные о стабильности подвижной фазы.

Степень извлечения. При использовании экстракции необходимо изучить степень извлечения известных и доступных примесей при оптимальных условиях. Необходимо представить данные, подтверждающие, что экстракция обеспечивает достаточную точность.

Получение производных. Если используют пред-или послеколоночное получение производных, необходимо установить оптимальные условия реакции (время, температура и др.) и исследовать стабильность полученных производных.

Тест «Проверка пригодности хроматографической системы». Как описано для ТСХ. Использование соотношения сигнал/шум требуется только тогда, когда предел определения и нормируемый предел содержания примеси близки.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Специфичность. Это желательное, но не основное требование. Если метод не специфичен, то возможность его использования обеспечивается низким уровнем содержания примесей, которые контролируются другим испытанием.

Тест «Проверка пригодности хроматографической системы». Как описано для ТСХ.

5.3.1. Газовая хроматография *(2.2.28)*

ИДЕНТИФИКАЦИЯ

Специфичность. Как описано для жидкостной хроматографии.

ИСПЫТАНИЯ НА ПРЕДЕЛЬНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ПРИМЕСЕЙ

Специфичность. Как описано для жидкостной хроматографии.

Коэффициент пересчета. Как описано для жидкостной хроматографии. Должны представляться коэффициенты пересчета нормируемой примеси относительно основного вещества. Это особенно важно при использовании селективных детекторов, таких как детектор по электронному захвату и т. п.

Пределы обнаружения и количественного определения. Как описано для жидкостной хроматографии.

Стабильность. Как описано для жидкостной хроматографии.

Получение производных. Как описано для жидкостной хроматографии.

Внутренний стандарт. Необходимо показать, что при выбранных условиях пик внутреннего стандарта не перекрывается с пиками возможных примесей или основного вещества.

Степень извлечения. Как описано для жидкостной хроматографии.

ТЕСТ «ПРОВЕРКА ПРИГОДНОСТИ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ»

Ниже приводятся некоторые особенности, которые необходимо учитывать для данного теста.

Отношение Сигнал/Шум. Обычно определяют для сигналов, равных или несколько больших, чем предел обнаружения и предел количественного определения.

Степень разделения. Определяют для пика анализируемого вещества и ближайшего пика примеси или для пика анализируемого вещества и пика внутреннего стандарта. Если коэффициент асимметрии отличается от принятого диапазона (0,8-1,2), целесообразно нормировать его пределы *(2.2.28).* Это особенно важно для тех случаев, когда используются набивные колонки или пик нормируемой примеси элюируется непосредственно за пиком основного вещества. Там, где возможно, подтверждают выполнение испытания с использованием колонок подобного типа.

Метод анализа равновесной паровой фазы. Этот метод применяют для анализа легколетучих веществ. Необходимо показать, что выбранные температура и время предварительного нагрева сосудов с анализируемым образцом обеспечивают установление равновесия. Валидация метода заключается в проведении повторных анализов образца. При этом после каждого введения пробы газовая фаза в сосуде замещается и сосуды снова уравновешиваются перед новым вводом газовой фазы. По полученным данным строят график зависимости логарифмов площадей пиков анализируемого вещества от числа экстракций и рассчитывают его характеристики. Близость коэффициента корреляции полученной зависимости к 1,0 свидетельствует о правильности выбора условий испытаний. Эффекты влияния матрицы можно устранить при использовании метода стандартных добавок.

КОЛИЧЕСТЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Специфичность. Как описано для жидкостной хроматографии.

Тест «Проверка пригодности системы». Как описано для жидкостной хроматографии.

6. Определение воды полумикрометодом (2.5.12)

Для подтверждения корректности использования йодсернистых реактивов, которые отличаются по составу от *йодсернистого реактива Р* (например, реактив Карла Фишера), следует провести валидацию одним из приведенных ниже методов.

6.1. Метод добавок

Определяют содержание воды (m_{H2O}, мг) в субстанции в соответствии с методикой, указанной в частной статье. Определение проводят не менее пяти разов. Затем к испытуемому образцу прибавляют, избегая попадания атмосферной влаги, подходящий объем стандартизированного раствора воды в *метаноле Р* и определяют содержание воды (m_i, мг). Определение проводят не менее пяти раз для разных объемов стандартизированного раствора в принятом диапазоне употребления методики.

Методом наименьших квадратов рассчитывают параметры линейной зависимости найденного содержания воды от количества прибавленной воды: тангенс угла наклона (b), точку пересечения с осью ординат (a) и точку пересечения экстраполированной калибровочной прямой с осью абсцисс (d).

Значение тангенса угла наклона b должен находиться в пределах от 0,975 до 1,025 (±2,5%). Относительные отклонения e_1 и e_2, в процентах, рассчитывают по формулам:

$$e_1 = \frac{a - m_{H2O}}{m_{H2O}} \times 100\% \qquad e_1 = \frac{d - m_{H2O}}{m_{H2O}} \times 100\%$$

e_1 и e_2 не могут превышать $\pm$2.5%.

Для каждого из определений рассчитывают найденное количество в процентах от прибавленного количества. Среднее значение пяти определений должно быть от 97,5% до 102,5%.

6.2. Сравнение с арбитражным методом

Определяют содержание воды полумикрометодом и другим подходящим валидированным методом, например, методом газовой хроматографии (2.2.28), методом термогравиметрического анализа (2.2.34) и др.

Средния значения, полученные полумикрометодом и арбитражным методом, не должны отличаться статистически значительно.

5.4. ОСТАТОЧНЫЕ КОЛИЧЕСТВА ОРГАНИЧЕСКИХ РАСТВОРИТЕЛЕЙ

Регламентация содержания остаточных растворителей в субстанциях, вспомогательных веществах и готовых лекарственных средствах

Данная общая фармакопейная статья устанавливает предельное содержание растворителей, которое может присутствовать в субстанциях, вспомогательных веществах и готовых лекарственных средствах в результате производственного процесса. Данная статья не распространяется на зарегистрированные лекарственные средства. Фармакопея применяет одни и те же принципы, описанные в ней к существующим субстанциям, вспомогательным веществам и готовым лекарственным средствам, независимо от того, являются они или нет объектом Фармакопеи. Все субстанции, вспомогательные материалы и готовые лекарственные средства должны проверяться на содержание тех растворителей, которые могут в них присутствовать.

Если при производстве разрешено использование растворителя класса 1, то его предельное содержание должно устанавливаться в частной фармакопейной статье.

Обычно частные статьи не включают тесты по контролю остаточных растворителей, относящихся к классу 2, так как применяемые растворители могут меняться в зависимости от производителя. Компетентные уполномоченные органы должны быть информированы о растворителях, используемых в производстве. Эта информация должна приводиться в досье, которое подается для регистрации.

Если используются растворители класса 3, то для контроля их содержания можно применять тест «Потеря в массе при высушивании» или тест, указанный в частной статье. Если для растворителей класса 3 обосновано и разрешено предельное содержание более 0,5%, то тест, указанный в частной статье, является обязательным. В этом случае расчеты ведутся с перерасчетом на безводное и свободное от остаточных растворителей вещество. Во всех случаях компетентные органы должны быть проинформированы об используемых растворителях класса 3.

Для контроля остаточных растворителей класса 1 или 2 (или класса 3 с содержанием более 0,5%) следует использовать, по возможности, методику, приведенную в частной статье 2.4.24. В ином случае следует применять подходящую валидированную методику.

5.4.1. ВВЕДЕНИЕ

Целью данной статьи является рекомендация приемлемых для безопасности больного количеств остаточных растворителей в лекарственных средствах. В статье рекомендуется использование менее токсичных растворителей, и описываются токсикологически обоснованные предельные содержания некоторых из них.

Остаточные растворители в лекарственных средствах определяются согласно данному руководству как летучие органические вещества, используемые или образующиеся при производстве субстанций, вспомогательных веществ или готовых лекарственных средств. Эти растворители полностью не удаляются в применяемом технологическом процессе. Выбор подходящего растворителя для синтеза субстанции может увеличить ее выход или обусловить такие характеристики, как кристаллическая форма, чистота и растворимость. Таким образом, растворитель иногда может быть критическим параметром в процессе синтеза. Данное руководство не распространяется на растворители, используемые в качестве вспомогательных веществ или относящиеся по составу к сольватам. Напротив, содержание растворителей в таких препаратах должно обосновываться и определяться.

Поскольку остаточные растворители не имеют терапевтического действия, адекватного действию лекарственного вещества, они должны удаляться до такой степени, чтобы удовлетворять требованиям спецификации, надлежащей производственной практики (GMP) или другим требованиям к качеству. Лекарственные средства не должны содержать остаточные растворители выше нормы, установленной данными по безопасности. Следует избегать использования при производстве субстанций, вспомогательных веществ и готовых лекарственных средств растворителей, имеющих высокую токсичность (класс 1, Табл. 1), если их применение не может быть достаточно обоснованным с точки зрения оценки «риск-польза». Содержание некоторых растворителей, имеющих меньшую токсичность (класс 2, Табл. 2), должно быть ограничено, чтобы исключить потенциальный побочный эффект. Идеально на практике должны использоваться менее токсичные растворители (класс 3, Табл. 3). Полный список растворителей, включенных в данное руководство, представлен в Приложении 1. Данный перечень не является исчерпывающим, он может дополняться другими используемыми растворителями. Рекомендуемые предельные содержания остаточных растворителей классов 1 и 2, а также классификация растворителей может изменяться по мере появления новых данных относительно их безопасности. Обоснование безопасности применения на рынке нового лекарственного средства, содержащего новый растворитель, отсутствующий в перечне растворителей (Приложение 1), может строиться на концепции данного руководства.

5.4.2. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Область применения статьи – остаточные растворители в лекарственных субстанциях, вспомогательных веществах и лекарственных средствах. Определение остаточных растворителей необходимо проводить, если известно, что процесс производства или очистки приводит к их появлению. Следует определять те растворители, которые используются или производятся в процессе изготовления или очистки лекарственных субстанций, вспомогательных веществ или лекарственных средств. Для определения содержания остаточных растворителей возможно как проведение испытания лекарственного средства, так и использование совокупного метода расчета, исходя из информации об их содержании во входящих ингредиентах, использованных в процессе производства лекарственного средства. Если на основании результатов вычисления, концентрация остаточных растворителей не превышает предела, рекомендуемого в настоящей статье, нет

необходимости проводить испытания готового лекарственного средства на содержание остаточных растворителей. Однако, если расчетная концентрация выше рекомендуемого предела, лекарственное средство должно быть проверено, чтобы установить, способствует ли процесс изготовления уменьшению уровня данного растворителя до приемлемого количества. Испытание готового лекарственного средства также необходимо проводить, если растворитель используется в процессе его производства.

Данная статья не относится ни к потенциально новым лекарственным субстанциям, вспомогательным веществам и лекарственным средствам, находящимся на стадии клинических испытаний, ни к зарегистрированным лекарственным средствам.

Статья применима ко всем дозированным формам и способам применения. В некоторых случаях, таких как: краткосрочное (30 дней или меньше) или местное применение, могут быть приемлемы более высокие уровни остаточных растворителей. Оценка таких уровней должна проводиться в каждом конкретном случае.

Дополнительную информацию по остаточным растворителям см. в Приложении 2.

5.4.3. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

5.4.3.1. КЛАССИФИКАЦИЯ ОСТАТОЧНЫХ РАСТВОРИТЕЛЕЙ ПО СТЕПЕНИ РИСКА

Международная программа по химической безопасности для описания пределов воздействия токсических химических реагентов использует термин «максимально допустимое ежедневное потребление» (TDI или ДЕП), а Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) и другие национальные и международные организации здравоохранения и институты используют термин «приемлемое ежедневное потребление» (ADI или ПЕП). С целью избежания путаницы, в данной статье определен новый термин «допустимая (разрешенная) суточная доза» (PDE или ДСД) - это максимально приемлемое суточное потребление остаточного растворителя в лекарственном средстве.

Остаточные растворители, которым дает оценку данная статья, перечислены в Приложении 1 общими названиями и структурными формулами. Они оценивались по степени возможного риска для здоровья человека и разделены на 3 класса:

Класс 1: Растворители, использование которых нужно избегать. Известные канцерогены для человека; предполагаемые канцерогены для человека; растворители, опасные для окружающей среды.

Класс 2: Растворители, использование которых нужно ограничивать. Не генотоксичные канцерогены для животных или растворители, которые могут вызвать другие необратимые эффекты, такие как нейротоксичность или тератогенность. Растворители, подозреваемые в другой существенной, но обратимой токсичности.

Класс 3: Малотоксичные растворители. Растворители с низким потенциалом токсичности для человека; для них не требуется установливать предельное содержание, обусловленное информацией о риске для здоровья человека. Растворители Класса 3 имеют ДСД от 50 мг/день и выше.

5.4.3.2. МЕТОДЫ УСТАНОВЛЕНИЯ ПРЕДЕЛЬНОГО СОДЕРЖАНИЯ

В Приложении 3 представлен метод для установления предельной суточной дозы остаточных растворителей.

5.4.3.3. ПОДХОДЫ УСТАНОВЛЕНИЯ ПРЕДЕЛЬНОГО СОДЕРЖАНИЯ РАСТВОРИТЕЛЕЙ КЛАССА 2

Для установления предельного содержания растворителей класса 2 могут использоваться два подхода.

Подход 1: Используют предельные концентрации в ppm из Табл. 2., которые были рассчитаны с помощью уравнения (1), исходя из предположения, что суточное потребление препарата составляет 10 г.

$$Концентрация\ (ppm) = \frac{1000 \cdot ДСД}{Доза}, \qquad (1)$$

где:
ДСД (допустимая суточная доза) выражается в мг/ день (сутки);
Доза – в г/день (сутки).

Эти предельные содержания остаточных растворителей рассматриваются как приемлемые для всех субстанций, вспомогательных веществ и лекарственных средств. Поэтому этот метод может быть использован, если суточная доза неизвестна или не установлена. Если содержание остаточных растворителей во всех вспомогательных веществах и лекарственных субстанциях, которые входят в состав готового лекарственного средства, удовлетворяет пределам, приведенным в Табл. 2, то все эти компоненты можно использовать в любой пропорции. Если суточная доза лекарственного средства не превышает 10 г, никакие дальнейшие вычисления не требуются. Определение предельного содержания остаточных растворителей в лекарственных средствах, которые принимаются в дозах, превышающих 10 г, должно проводиться с использованием Подхода 2.

Подход 2. Нет необходимости, чтобы содержание остаточных растворителей в каждом компоненте лекарственного средства соответствовало пределам, регламентированным с использованием Подхода 1.

Определить предельное содержание остаточного растворителя в лекарственном средстве, можно по формуле (1), используя ДСД (мг/ сутки), приведенное в Табл. 2, и известное значение максимальной суточной дозы лекарственного средства. Такие пределы являются приемлемыми при условии, что показано снижение содержания остаточного растворителя до минимума, который достигается практически. Пределы должны быть реалистичными в отношении аналитической точности, производственной возможности, разумного изменения производственного процесса, и пределы должны соответствовать современным производственным стандартам.

Подход 2 предусматривает суммирование количеств остаточного растворителя, присутствующего в каждом из компонентов готового лекарственного средства. Суммарное содержание растворителя в сутки должно быть меньше, чем ДСД.

Рассмотрим использование Подхода 1 и Подхода 2 для расчета предельного содержания ацетонитрила в лекарственном средстве. ДСД для ацетонитрила – 4,1 мг/сутки. Таким образом, его предельное содержание с использованием Подхода 1

– 410 ppm. Максимально потребляемая масса лекарственного средства в сутки – 5,0 г. Лекарственное средство содержит два вспомогательных вещества. Состав лекарственного средства и расчетное предельное содержание ацетонитрила приведены в таблице:

Компонент	Количество в составе, г	Содержание ацетонитрила, ppm	Суточное воздействие, мг
Лекарственная субстанция	0,3	800	0,24
Вспомогательное вещество 1	0,9	400	0,36
Вспомогательное вещество 2	3,8	800	3,04
Лекарственное средство	5,0	728	3,64

Концентрация ацетонитрила во вспомогательном веществе 1 удовлетворяет предельному значению, установленному с использованием Подхода 1, но его концентрация в лекарственной субстанции, вспомогательном веществе 2 и лекарственном средстве не удовлетворяет. Тем не менее, содержание ацетонитрила в готовом лекарственном средстве, установленное с использованием Подхода 2, не превышает предела 4,1 мг/сутки и, следовательно, соответствует рекомендациям данного руководства.

Рассмотрим другой пример для ацетонитрила в качестве остаточного растворителя. Максимальная потребляемая масса лекарственного средства в сутки – 5,0 г, и лекарственное средство содержит два вспомогательных вещества. Состав лекарственного средства и расчетное максимальное содержание ацетонитрила приведены в следующей таблице:

Компонент	Количество в составе, г	Содержание ацетонитрила, ppm	Суточное воздействие, мг
Лекарственная субстанция	0,3	800	0,24
Вспомогательное вещество 1	0,9	2000	1,80
Вспомогательное вещество 2	3,8	800	3,04
Лекарственное средство	5,0	1016	5,08

В данном случае, концентрация ацетонитрила в лекарственном средстве не удовлетворяет предельному значению ни с использованием Подхода 1 ни Подхода 2. Производитель может провести испытания лекарственного средства, чтобы определить, снижает ли процесс производства содержание ацетонитрила. Если же содержание ацетонитрила не уменьшается в процессе производства до допустимого предела, производитель должен предпринять другие шаги для уменьшения концентрации ацетонитрила в лекарственном средстве. Если все предпринятые меры не приведут к уменьшению содержания остаточного растворителя, в исключительных случаях производитель может подготовить резюме о предпринятых усилиях, направленных на уменьшение содержания растворителя до норм данного руководства, и провести анализ выгоды риска, чтобы получить разрешение на использование препарата, содержащего более высокий уровень остаточного растворителя.

5.4.3.4. АНАЛИТИЧЕСКИЕ МЕТОДИКИ

Остаточные растворители, как правило, определяются с использованием хроматографических методов, в частности газовой хроматографии. Для определения содержания остаточных растворителей могут использоваться любые подходящие методики, описанные в Фармакопеях. Иначе говоря, производители должны быть свободны в выборе наиболее подходящей валидированной аналитической методики для конкретного применения. Если присутствуют только

растворители Класса 3, могут быть использованы неспецифические методы контроля, такие как, например, потеря в массе при высушивании.

Валидация (проверка правильности) методов контроля остаточных растворителей должна соответствовать руководствам ICH: «Валидация аналитических методик» и «Валидация аналитических методик ГФ РБ».

5.4.3.5. ИНФОРМАЦИЯ О СОДЕРЖАНИИ ОСТАТОЧНЫХ РАСТВОРИТЕЛЕЙ

Производителям лекарственных средств необходима надежная информация о содержании остаточных растворителей во вспомогательных веществах или лекарственных субстанциях. Информация о содержании остаточных растворителей, которая может передаваться производителям лекарственных средств поставщиками субстанций или вспомогательных веществ может быть представлена в следующих вариантах:

1. Вероятно присутствуют остаточные растворители только класса 3. Тест "Потеря в массе при высушивании" - менее 0,5 %;
2. Вероятно присутствуют остаточные растворители только класса 2; содержание каждого из них не превышает предельной концентрации в ppm, указанной в таблице 2; указывают наименование каждого из них.
3. Вероятно присутствуют остаточные растворители класса 2 и 3, содержание каждого из растворителей класса 2 не превышает предельной концентрации в ppm, указанной в таблице 2; а содержание растворителей класса 3 - менее 0,5 %.

Если существует вероятность присутствия растворителей класса 1, то каждый из них должен быть идентифицирован и определен количественно.

«Вероятно присутствуют» - относится к растворителям, используемым на заключительном этапе производства и тем, которые используются на ранних стадиях производства и полностью не удаляются утвержденным (валидированным) процессом.

Если присутствуют остаточные растворители класса 2 выше предельной концентрации по Методу 1, и остаточные растворители класса 3 превышают 0,5 %, то каждый из них должен быть идентифицирован и определен количественно.

5.4.4. ПРЕДЕЛЬНЫЕ СОДЕРЖАНИЯ ОСТАТОЧНЫХ РАСТВОРИТЕЛЕЙ

5.4.4.1. РАСТВОРИТЕЛИ, ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КОТОРЫХ НУЖНО ИЗБЕГАТЬ

Растворители Класса 1 не должны использоваться в производстве фармацевтических субстанций, вспомогательных веществ и лекарственных средств из-за их высокой токсичности и вредного воздействия на окружающую среду. Однако, если их использование неизбежно для производства лекарственного средства, которое имеет сильно выраженный терапевтический эффект, их количества должны быть ограничены в соответствии с Табл.1, если иное не обосновано. 1,1,1-тирхлорэтан включен в Табл. 1, потому что он опасен для окружающей среды. Установленный предел в 1500 ppm основан на обзоре данных о безопасности.

Таблица 1

Растворители Класса 1 в лекарственных средствах (растворители, применения которых нужно избегать).

Растворитель	**Концентрационный предел (ppm)**	**Влияние**
Бензол	2	канцероген
Четыреххлористый углерод	4	токсичен и опасен для окружающей среды
1,2-дихлорэтан	5	токсичен
1,1-дихлорэтен	8	токсичен
1,1,1-трихлорэтан	1500	опасен для окружающей среды

5.4.4.2. РАСТВОРИТЕЛИ, ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КОТОРЫХ НУЖНО ОГРАНИЧИВАТЬ

Содержание растворителей, приведенных в Табл. 2, должно быть ограничено в лекарственных средствах в связи с их токсичностью. Данные ДСД даны с точностью до 0,1 мг/сутки, а концентрации - с точностью до 10 ppm. Установленные значения не отражают необходимую аналитическую точность определения. Точность должна быть определена как часть валидации (проверки правильности) методики.

Таблица 2

Растворители класса 2 в лекарственных средствах

Растворитель	**ДСД (мг/день)**	**Концентрационный предел (ppm)**
2-метоксиэтанол	0,5	50
метилбутилкетон	0,5	50
нитрометан	0,5	50
хлороформ	0,6	60
1,1,2- трихлорэтен	0,8	80
диметоксиэтан	1,0	100
тетралин	1,0	100
2-этоксиэтанол	1,6	160
сульфолан	1,6	160
пиридин	2,0	200
формамид	2,2	220
гексан	2,9	290
хлорбензол	3,6	360
1,4-диоксан	3,8	380
ацетонитрил	4,1	410
дихлорметан	6,0	600
этиленгликоль	6,2	620
N,N-диметилформамид	8,8	880
толуол	8,9	890
N,N-диметилацетамид	10,9	1090
метилциклогексан	11,8	1180
1,2-дихлорэтен	18,7	1870
ксилол	21,7	2170

метанол	30,0	3000
циклогексан	38,8	3880
N- метилпирролидон	48,4	4840

5.4. 4.3.МАЛОТОКСИЧНЫЕ РАСТВОРИТЕЛИ

Растворители Класса 3 (представлены в Табл.3) могут можно отнести к менее токсичным и обладающим меньшим риском для здоровья человека. Класс 3 не включает растворители, известные как опасные для здоровья человека в концентрациях, которые обычно допускаются в лекарственных средствах. Однако, для многих растворителей Класса 3 не проводилось долгосрочное изучение токсичности или канцерогенности. Доступные данные указывают на то, что они менее токсичны в острых или краткосрочных испытаниях и дают отрицательный результат в испытаниях на генотоксичность (не проявляют генотоксичность). Считается, что содержание этих остаточных растворителей равное 50 мг/сутки или меньше (соответствует 5000 ppm или 0,5% по Методу 1) приемлемы без обоснования. Более высокие значения также могут быть приемлемы, при условии, что они определяются возможностями производства, которое отвечает требованиям надлежащей производственной практики (НПП).

Таблица 3

Растворители Класса 3, которые должны быть ограничены требованиями НПП или другими требованиями к качеству.

Анизол	Метилизобутилкетон
Ацетон	2-метил-1-пропанол
1-бутанол	Муравьиная кислота
2-бутанол	Пентан
Бутилацетат	1-пентанол
Трет-бутилметиловый эфир	1-пропанол
Гептан	2-пропанол
Диметилсульфоксид	Пропилацетат
Изобутилацетат	Тетрагидрофуран
Изопропилацетат	Уксусная кислота
Кумол	Этанол
Метилацетат	Этилацетат
3-метил-1-бутанол	Этиловый эфир
Метилэтилкетон	Этилформиат

5.4.4.4. РАСТВОРИТЕЛИ, ДЛЯ КОТОРЫХ ОТСУТСТВУЮТ НЕОБХОДИМЫЕ ДАННЫЕ О ТОКСИЧНОСТИ

Растворители, представленные в Табл. 4 могут также представлять интерес для производителей вспомогательных веществ, лекарственных субстанций или лекарственных средств. Однако, для них отсутствуют обоснованные данные о токсичности. Производители должны сами обосновывать остаточные содержания этих растворителей в лекарственных средствах.

Таблица 4

Растворители, для которых отсутствуют обоснованные данные о токсичности

1,1-диэтоксипропан	Метилизопропилкетон
1,1-диметоксиметан	Метилтетрагидрофуран
2,2-диметоксипропан	Петролейный эфир
Изооктан	Трихлоруксусная кислота
Изопропиловый эфир	Трифторуксусная кислота

ТЕРМИНЫ:

Генотоксичные канцерогены - канцерогены, которые вызывают появление злокачественныз опухолей, воздействуя на гены или хромосомы.

*Минимальный уровень, с которого наблюдается эффект (*МУНЭ*)* - минимальная доза (вещества) в испытании или серии испытаний, которая вызывает биологически существенное увеличение в частоте или серьезности любых эффектов у людей или животных.

Коэффициент корреляции- коэффициент, определенный в соответствии с обоснованным заключением токсиколога и основанный на экстраполяции на чекловека данных по безопасности, полученных при испытаниях на животных.

Нейротоксичность - способность вещества оказывать неблагоприятное воздействие на нервную систему.

*Уровень, при котором не наблюдается эффект (*УННЭ*)* - максимальная доза вещества, при которой нет биологически существенных увеличений в частоте или серьезности любых эффектов у людей или животных.

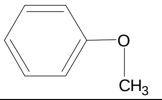
ДСД - разрешенная (допустимая) суточная доза - максимально приемлемое суточное потребление остаточного растворителя в лекарственном средстве.

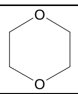
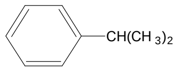
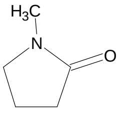
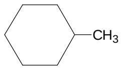
Обратимая токсичность - возникновение вредных эффектов, которые вызваны данным веществом и исчезают после прекращения действия вещества.

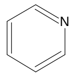
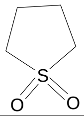
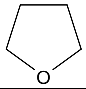
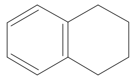
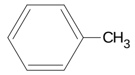
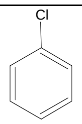
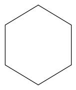
Предполагаемый канцероген человека - вещество, для которого нет эпидемиологической очевидности канцерогенеза, но есть положительные данные по генотоксичности и очевидность канцерогенеза у грызунов.

Тератогенность - возникновение структурных уродств в развивающемся зародыше, когда вещество принимается в период беременности.

Приложение 1. Список растворителей, включенных в руководящие указания

Растворитель	Другое название	Структура	Класс
Анизол	Метоксибензол, метилфениловый эфир		Класс 3
Ацетон	Диметилкетон, 2-пропанон	CH_3COCH_3	Класс 3
Ацетонитрил[3]		CH_3CN	Класс 2
Бензол[4]		C_6H_6	Класс 1
1-бутанол	Н-бутиловый спирт, пропилкарбинол	$CH_3(CH_2)_3OH$	Класс 3
2-бутанол	Втор-бутиловый спирт, метилэтилкарбинол	$CH_3CH_2CH(OH)CH_3$	Класс 3
Бутилацетат	Бутиловый эфир уксусной кислоты	$CH_3COO(CH_2)_3CH_3$	Класс 3
трет-	2-метокси-2метилпропан	$(CH_3)_3COCH_3$	Класс 3

бутилметиловый эфир			
Гептан	Н-гептан	$CH_3(CH_2)_5CH_3$	Класс 3
Гексан[29]	Н-гексан	$CH_3(CH_2)_4CH_3$	Класс 2
N,N-диметилацетамид	Диметиламид уксусной кислоты, ДМА	$CH_3CON(CH_3)_2$	Класс 2
Диметилсульфоксид	Метилсульфинилметан, Метилсульфоксид, ДМСО	$(CH_3)_2SO$	Класс 3
N,N-диметилформамид	Диметиламид уксусной кислоты, ДМФ	$HCON(CH_3)_2$	Класс 2
1,2- диметоксиэтан[64]	Диметиловый эфир этиленгликоля, диметилцеллозольв	$H_3COCH_2CH_2OCH_3$	Класс 2
1,4-диоксан[23]	Диэтилендиоксид, р-диоксан		Класс 2
Дихлорметан[17]	Метиленхлорид	CH_2Cl_2	Класс 2
1,2- дихлорэтан[14]	Этилендихлорид	CH_2ClCH_2Cl	Класс 1
1,1-дихлорэтен[15]	1,1-дихлорэтилен	$H_2C{=}CCl_2$	Класс 1
1,2-дихлорэтен[16a]	1,2-дихлорэтилен	$ClHC{=}CHCl$	Класс 2
Изобутилацетат	Изобутиловый эфир уксусной кислоты	$CH_3COOCH_2CH(CH_3)_2$	Класс 3
Изопропилацетат	Изопропиловый эфир уксусной кислоты	$CH_3COOCH(CH_3)_2$	Класс 3
Ксилол[*54]	Диметилбензол	$(CH_3)_2C_6H_4$	Класс 2
Кумол	Изопропилбензол, 1-метилэтилбензол		Класс 3
Метанол[34]	Метиловый спирт	CH_3OH	Класс 2
Метилацетат	Метиловый эфир уксусной кислоты	CH_3COOCH_3	Класс 3
3-метил-1- бутанол	Изоамиловый спирт, изопентанол	$(CH_3)_2CHCH_2CH_2OH$	Класс 3
Метилбутилкетон[30]	2-гексанон	$CH_3(CH_2)_3COCH_3$	Класс 2
Метилизобутил-кетон	4-метил-2-пентанон МИБК	$CH_3COCH_2CH(CH_3)_2$	Класс 3
N- метилпирролидон	1-метил-2-пирролидон		Класс 2
2-метил-1-пропанол	Изобутиловый спирт	$(CH_3)_2CHCH_2OH$	Класс 3
Метилциклогексан[62]	Циклогексилметан		Класс 2
Метилэтилкетон	2-бутанол, МЭК	$CH_3CH_2COCH_3$	Класс 3
2-метоксиэтанол	Метилцеллозольв	$CH_3OCH_2CH_2OH$	Класс 2
Муравьиная кислота		$HCOOH$	Класс 3
Нитрометан[63]		CH_3NO_2	Класс 2
Пентан	Н-пентан	$CH_3(CH_2)_3CH_3$	Класс 3
1-пентанол	Амиловый спирт	$CH_3(CH_2)_3CH_2OH$	Класс 3

Пиридин[49]			Класс 2
1-пропанол	Пропиловый спирт	$CH_3CH_2CH_2OH$	Класс 3
2-пропанол	Изопропиловый спирт	$(CH_3)_2CHOH$	Класс 3
Пропилацетат	Пропиловый эфир уксусной кислоты	$CH_3COOCH_2CH_2CH_3$	Класс 3
Сульфолан	Тетрагидротиофен-1,1-диоксид		Класс 2
Тетрагидрофуран	Тетраметиленоксид		Класс 3
Тетралин[61]	1,2,3,4-тетрагидронафталин		Класс 2
Толуол[51]	Метилбензол		Класс 2
1,1,1-трихлорэтан[52]	Метилхлороформ	CH_3CCl_3	Класс 1
1,1,2- трихлорэтен[53]	Трихлорэтен	$HClC=CCl_2$	Класс 2
Уксусная кислота	Этановая кислота	CH_3COOH	Класс 3
Формамид	Метанамид	$HCONH_2$	Класс 2
Хлорбензол[58]			Класс 2
Хлороформ[11]	Трихлорметан	$CHCl_3$	Класс 2
Циклогексан[13]	Гексаметилен		Класс 2
Четыреххлористый углерод[10]	Тетрахлорметан	CCl_4	Класс 1
Этанол	Этиловый спирт	CH_3CH_2OH	Класс 3
Этилацетат	Этиловый эфир уксусной кислоты	$CH_3COOCH_2CH_3$	Класс 3
Этиленгликоль	1,2-дигидроксиэтан, 1,2-этандиол	$HOCH_2CH_2OH$	Класс 2
Этиловый эфир	Диэтиловый эфир, этоксиэтан, 1,1'-оксибисэтан, серный эфир	$CH_3CH_2OCH_2CH_3$	Класс 3
Этилформиат	Этиловый эфир муравьиной кислоты	$HCOOCH_2CH_3$	Класс 3
2-этоксиэтанол	Целлозоль	$CH_3CH_2OCH_2CH_2OH$	Класс 2

*- обычно 60% м-ксилола, 14% п-ксилола, 9% о-ксилола с 17% этилбензола.

Примечание: числовые индексы растворителей (цифры вверху) соответствуют номерам пиков на типичных хроматограммах остаточных растворителей (рис.2.4.24.-1, рис.2.4.24.-2, рис.2.4.24.-3, рис.2.4.24.-4) в разделе 2.4.24.

ПРИЛОЖЕНИЕ 2. ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ ДАННЫЕ

А 2.1. ВЛИЯНИЕ ОРГАНИЧЕСКИХ ЛЕТУЧИХ РАСТВОРИТЕЛЕЙ НА ОКРУЖАЮЩУЮ СРЕДУ

Некоторые из остаточных растворителей, часто используемых в фармацевтическом производстве, внесены в перечень токсичных химических соединений в монографиях «Критерии здоровья окружающей среды» (ЕНС) и «Объединенная система информации риска» (IRIS). Цели таких организаций, как Международная программа по химической безопасности (IPSC), Управление по охране окружающей среды США (USEPA), Управление лекарственных средств и пищевых продуктов (USFDA) включают определение предельного содержания химических веществ. Основная их цель - защита человеческого здоровья и окружающей среды от возможного негативного влияния химических соединений в результате длительного воздействия. Методы, используемые для оценки максимальных, безопасных пределов воздействия, обычно основываются на долгосрочных исследованиях. Когда данные долгосрочных испытаний недоступны, могут быть использованы данные краткосрочных испытаний с модификацией подхода, например, использование более высоких коэффициентов корреляции.

Подход, описанный в настоящей статье, относится прежде всего к долгосрочным воздействиям или воздействиям на продолжительность жизни популяции окружающей среды, в частности, воздуха,продовольствия, питьевой воды и др.

А 2.2. ОСТАТОЧНЫЕ РАСТВОРИТЕЛИ В ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВАХ

Пределы воздействия в этой статье установлены в соответствии с методологией и данными токсичности, приведенными в монографиях ЕСН и IRIS. Однако, при установлении пределов воздействия должны быть приняты некоторые допущения относительно остаточных растворителей, которые используются в процессе синтеза и изготовления лекарственных средств, а именно:

1) Пациенты используют лекарственные средства для лечения болезней или для профилактики с целью избежать инфекции или болезни.

2) Предположение о воздействии на продолжительность жизни пациента не обязательно для большинства лекарственных средств, но может рассматриваться как рабочая гипотеза, чтобы уменьшить риск для здоровья человека.

3) Остаточные растворители - неизбежные компоненты фармацевтического производства и зачастую являются составной частью лекарственных средств.

4) Остаточные растворители не должны превышать рекомендуемые концентрации, кроме исключительных обстоятельств.

5) Данные о токсикологических испытаниях, которые используются для определения приемлемых концентраций остаточных растворителей, должны быть зафиксированы с использованием соответствующих протоколов, описанных, например, в документах OECD, EPA и FDA Red Book.

ПРИЛОЖЕНИЕ 3. МЕТОДЫ УСТАНОВЛЕНИЯ ДОПУСТИМОЙ СУТОЧНОЙ ДОЗЫ

Для оценки риска канцерогенных растворителей Класса 1 используют метод Гейлора-Коделя (Gaylor, D.W. and Kodell, R.l.: Linear Interpolation algorithm for low dose assessment of toxic substance. J. Environ. Pathology, 4, 305, 1980). Для установления ДСД экстраполяцию с использованием математических моделей следует применять только в тех случаях, когда есть достоверные данные о

канцерогенности. ДСД для растворителей Класса 1 также может определяться с использованием высокого значения коэффициета корреляции (например, от 10000 до 100000) для уровня, при котором эффект не наблюдается. Обнаружение и количественное определение этих растворителей следует проводить валидированными аналитическими методиками.

Предельные содержания для растворителей Класса 2 в этом руководстве были установлены путем вычисления значений ДСД согласно методикам определения предельного содержания растворителей в лекарственных средствах (Pharmacopeial Forum, ноябрь-декабрь 1989г.) и методам, принятым IPCS для оценки риска химических веществ в отношении здоровья человека (Environmental Health Criteria 170, ВОЗ, 1994). Эти методы подобны тем, которые используют USEPA (IRIS), USFDA (Красная книга) и др. Метод описан ниже, чтобы пояснить происхождение значений ДСД. Чтобы использовать значения ДСД, приведенные в таблице Раздела 4 этого документа, нет необходимости производить эти вычисления.

При экспериметах на животных значения ДСД рассчитывают исходя из уровня, при котором эффект не наблюдается (УННЭ) или уровня, при котором наблюдается самый низкий эффект (МУНЭ) по формуле:

$$ДСД = \frac{УННЭ \cdot Масса\ тела}{F_1 \cdot F_2 \cdot F_3 \cdot F_4 \cdot F_5},$$

Значение ДСД преимущественно получают на основании УННЭ. Если значения УННЭ неизвестны, могут быть использованы значения МУНЭ. Коэффициенты корреляции, предложенные здесь для экстраполяции на человека данных, полученных на животных, это те же «коэффициенты неопределенности», которые использовались в монографии «Критерии здоровья окружающей среды» (Environmental Health Criteria 170, ВОЗ, Женева, 1994) и «коэффициенты корреляции» или «коэффициенты безопасности» - в «Pharmacopeial Forum”. Во всех расчетах принимается предположение о 100% системном воздействии независимо от способа применения лекарств.

Коэффициенты корреляции:

F1 – коэффициент корреляции для расчета экстраполяции между видами

F1 = 5 при экстраполяции на человека данных, полученных при исследованиях на крысах

F1 = 12 при экстраполяции на человека данных, полученных при исследованиях на мышах

F1 = 2 при экстраполяции на человека данных, полученных при исследованиях на собаках

F1 = 2,5 при экстраполяции на человека данных, полученных при исследованиях на кроликах

F1 = 3 при экстраполяции на человека данных, полученных при исследованиях на обезъянах

F1 = 10 при экстраполяции на человека данных, полученных при исследованиях на других животных

F1 принимает во внимание отношение площади поверхности тела: к весу тела соответствующих видов животных и человека. Площадь поверхности рассчитывается следующим образом:

$$S = kM^{0,67},$$

где:

M – масса тела,

k – константа, принята равной 10.

Массы тела, используемые в уравнении, представлены в таблице А 3.1.

F2 = коэффициент 10 , учитывающий индивидуальную изменчивость . Для всех органических растворителей, приведенных в данном руководстве, коэффициент обычно принимают равным 10.

F3 = переменный коэффициент для расчета испытаний токсичности кратковременных воздействий.

F3 = 1, для испытаний, которые длятся по меньшей мере в течение периода равного половине продолжительности жизни животных (1 год для грызунов и кроликов; 7 лет для собак, котов и обезьян).

F3 = 1, для репродуктивных (воспроизводительных) испытаний, которые охватывают весь период органогенеза.

F3 = 2, для испытаний в течение 6 месяцев на грызунах, или 3,5 лет - не на грызунах.

F3 = 5, для 3-х месячных испытаний на грызунах, или 2-х летних – на не грызунах.

F3 = 10, для испытаний более короткой продолжительности.

Для всех промежуточных испытаний необходимо использовать более высокий коэффициент (например, для 9-месячных испытаний на грызунах используется коэффициент =2).

F4 = коэффициент, который может применяться при высокой токсичности растворителя, например, негенотоксичной канцерогенности, нейротоксичности или тератогенности. В испытаниях репродуктивной токсичности используются следующие коэффициенты:

F4 = 1, для эмбриональной токсичности, связанной с материнской токсичностью (интоксикацией)

F4 = 5, для эмбриональной токсичности (интоксикацией), не связанной с материнской

F4 = 5, для тератогенного эффекта, связанного с материнской интоксикацией

F4 = 10, для тератогенного эффекта, не связанного с материнской интоксикацией.

F5 = переменный коэффициент, который может применяться, если УННЭ (уровень, не вызывающий эффекта) не был установлен. Когда доступны только данные уровня МУНЭ (уровень, вызывающий минимальный эффект) то, в зависимости от уровня токсичности, может использоваться коэффициент вплоть до 10.

Допускается, что масса тела взрослого человека любого пола равна 50 кг. Этот относительно низкий вес обеспечивает дополнительный коэффициент безопасности стандартному весу человека 60 или 70 кг, который часто используется в таких вычислениях. Известно, что многие взрослые пациенты весят менее 50 кг, поэтому в этом случае при определении ДСД используются другие коэффициенты. Если лекарственное средство, содержащее растворитель, предназначено длч педиатрии, то необходимо сделать корректировку на более низкую массу тела.

Как пример применения этого уравнения, рассмотрим испытание токсичности ацетонитрила на мышах, которое было описано в Pharmeuropa, т.9, №1. Дополнение. Апрель 1997, с. S24. Установлено, что значение УННЭ – 50,7 мг/кг • сутки. ДСД для ацетонитрила при этом рассчитывали следующим образом:

$$ДСД = \frac{50{,}7 мг \cdot кг^{-1} \cdot сутки^{-1} \cdot 50 кг}{12 \cdot 10 \cdot 5 \cdot 1 \cdot 1} = 4{,}22 мг / сутки$$

В этом примере

F1 = 12, учитывает экстраполяцию на человека данных, полученных при исследованиях на мышах

F2 = 10, учитывает индивидуальную изменчивость

F3 = 5, так как продолжительность испытаний составила только 13 недель

F4 = 1, так как с серьезной токсичностью не сталкивались

F5 = 1, так как не был определен уровень, не вызывающий эффекта

Таблица А 3.1

Значения, использованные при расчетах в данном документе.

Вес крысы	330 г	Дыхательный объем мыши	43л/сутки
Вес беременной крысы	425 г	Дыхательный объем кролика	1440 л/сутки
Вес мыши	28 г	Дыхательный объем морской свинки	430 л/сутки
Вес беременной мыши	30 г	Дыхательный объем человека	28800 л/сутки
Вес морской свинки	500 г	Дыхательный объем собаки	9000 л/сутки
Вес макаки-резус	2,5 кг	Дыхательный объем обезьяны	1150 л/сутки
Вес кролика (беременного или нет)	4 кг	Потребление воды мышью	5 мл/сутки
Вес гончей собаки (бигль)	11,5 кг	Потребление воды крысой	30 мл/сутки
Дыхательный объем крысы	290л/ сутки	Потребление пищи крысой	30 г/сутки

Для перерасчета концентраций газов, используемых в дыхательных (ингаляторных) испытаниях из ppm в мг/л или мг/м^3 , использовали уравнение для идеального газа: PV = nRT. Рассмотрим в качестве примера испытание репродуктивной токсичности крысы в результате вдыхания четыреххлористого углерода (М.м. 153,84), описанное в Pharmeurope, т.9, №1, Дополнение, апрель 1997, стр. S9.

$$\frac{n}{V} = \frac{P}{RT} = \frac{300 \cdot 10^{-6} атм. \ \cdot \ 153840 мг \cdot моль^{-1}}{0{,}082 л \cdot атм. \cdot К^{-1} \cdot моль^{-1} \ \cdot \ 298 \cdot К} = \frac{46{,}15 мг}{24{,}45 л} = 1{,}89 мг / л$$

Для приведения к мг/м^3 использовали соотношение 1000 л = 1 м^3

Таблица А 3.2

Сокращения и обозначения

ICH	Международная конференция по гармонизации технических возможностей по регистрации лекарственных средств для людей International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use
CPMP/ICH/283/95	Постановление о регламентации остаточных растворителей Guidelines for residual solvents
IPCS	Международная программа по химической безопасности International Program on Chenical Safety
GMP (НПП)	Надлежащая производственная практика Good manufacturing practice
TDI	Ежедневная хорошо переносимая доза Tolerable daily intake
ADI	Ежедневная допустимая доза Acceptable daily intake
PDE (ДСД)	Допустимая суточная доза Permitted daily exposure
LOEL (МУНЭ)	Минимальный уровень наблюдаемого эффекта Lowest-observed effect level
NOEL (УННЭ)	Уровень не наблюдаемого эффекта No-observent-effect level
EHC	«Критерий состояния окружающей среды» «Environmental Health Criteria»
IRIS	Информационная система совокупного риска Integrated Risk Information System
OECD	Организация по экономическому содружеству и развитию Organization for Economic Cooperation and Development
US EPA	Управление охраны окружающей среды Соединенных Штатов United States Environmental Protection Agency
US FDA	Управление продовольственных продуктов и лекарственных средств Соединенных штатов United States Food and Drug Administration

5.5. АЛКОГОЛЕМЕТРИЧЕСКИЕ ТАБЛИЦЫ

Таблица 5.5.-1.

Соотношение между плотностью водно-спиртового раствора и содержание этанола в растворе

Плотность ρ20	Содержание этанола в водно-спиртовом растворе				Плотность ρ20	Содержание этанола в водно-спиртовом растворе			
	в процентах		граммов в 100 мл при 20⁰C	миллилитров в 100 г при взвешивании в воздухе		в процентах		граммов в 100 мл при 20⁰C	миллилитров в 100 г при взвешивании в воздухе
	по массе	по объему				по массе	по объему		
0,99823	0,00	0,00	0,00	0,00	0,9878	6,00	52	94	62
80	12	16	13	16	6	13	67	6,05	77
0,9978	23	29	23	29	4	26	83	18	94
6	34	43	34	43	2	39	99	31	8,10
4	44	56	44	56	0	52	8,15	43	27
2	55	70	55	70	0,9868	65	32	57	44
0	66	83	66	83	6	78	48	69	61
0,9968	77	97	77	97	4	92	64	82	77
6	87	1,10	87	1,10	2	7,05	80	95	93
4	98	24	98	24	0	18	97	7,08	9,11
2	1,09	38	1,09	38	0,9858	32	9,13	21	27
0	20	51	19	51	6	45	30	34	45
0,9958	31	65	32	66	4	58	47	47	62
6	42	79	41	80	2	72	63	60	78
4	52	92	52	93	0	85	80	73	96
2	63	2,06	63	2,07	0,9848	99	97	87	10,13
0	74	20	74	21	6	8,12	10,13	8,00	30
0,9948	85	34	85	35	4	26	30	13	47
6	96	48	96	50	2	39	47	26	65
4	2,07	62	2,07	64	0	53	63	39	82
2	19	76	18	78	0,9838	67	80	52	99
0	29	90	29	92	6	80	97	66	11,17
0,9938	41	3,04	40	3,06	4	94	11,14	79	34
6	52	18	51	20	2	9,08	31	93	52
4	63	32	62	34	0	22	48	9,06	70
2	75	46	73	48	0,9828	35	65	19	87
0	86	60	84	63	6	49	82	33	12,04
0,9928	97	74	95	77	4	63	99	46	22
6	3,09	89	3,07	92	2	77	12,16	60	40
4	20	4,03	18	4,06	0	91	34	74	58
2	32	17	29	20	0,9818	10,05	51	87	75
0	44	32	41	36	6	19	68	10,01	93
0,9918	55	46	52	50	4	34	85	14	13,11
6	67	61	64	65	2	48	13,03	28	29
4	78	75	75	80	0	62	20	42	47
2	90	90	87	95	0,9808	76	38	56	66
0	4,02	5,05	99	5,10	6	91	55	69	83
0,9908	14	20	4,10	25	4	11,05	73	84	14,02
6	26	35	22	41	2	20	90	97	20
4	38	50	34	56	0	34	14,08	11,11	38
2	50	65	46	71	0,9798	49	26	25	57
0	62	80	58	87	6	64	44	40	76
0,9898	75	95	70	6,02	4	78	62	54	94
6	87	6,10	81	17	2	93	79	67	15,12
4	99	26	94	34	0	12,07	97	82	31
2	5,11	41	5,06	49	0,9788	22	15,15	96	50
0	24	57	19	65	6	37	34	12,11	69
0,9888	37	73	31	81	4	52	52	25	88
6	49	88	43	97	2	67	70	39	16,07
4	62	7,04	56	7,13	0	81	88	53	26
2	75	20	68	29	0,9778	96	16,06	68	44
0	87	36	81	46	6	13,11	25	83	66

Продолжение таблицы 5.5.-1.

Плотность ρ_{20}	Содержание этанола в водно-спиртовом растворе				Плотность ρ_{20}	Содержание этанола в водно-спиртовом растворе			
	в процентах		граммов в 100 мл при 20^{0}C	миллилитров в 100 г при взвешивании в воздухе		в процентах		граммов в 100 мл при 20^{0}C	миллилитров в 100 г при взвешивании в воздухе
	по массе	по объему				по массе	по объему		
4	27	43	97	83	4	65	51	92	47
2	42	61	13,11	17,01	2	80	68	21,06	65
0	57	80	26	21	0	94	85	19	83
0,9768	72	98	40	40	0,9658	22,09	27,03	33	28,02
6	87	17,17	55	60	6	23	20	47	20
4	14,02	35	69	79	4	37	37	60	38
2	18	54	84	99	2	52	54	74	56
0	33	73	99	18,19	0	66	71	87	75
0,9758	49	91	14,14	38	0,9648	81	88	22,00	93
6	64	18,10	29	58	6	95	28,05	14	29,12
4	80	29	44	78	4	23,09	22	27	29
2	96	48	59	97	2	23	38	40	47
0	15,11	67	74	19,17	0	38	55	53	65
0,9748	27	86	89	37	0,9638	52	72	67	83
6	43	19,05	15,04	57	6	66	88	79	30,00
4	58	24	19	77	4	80	29,05	93	18
2	74	43	34	97	2	94	21	23,05	36
0	90	62	49	20,16	0	24,08	38	19	54
0,9738	16,05	81	64	36	0,9628	22	54	32	71
6	21	20,00	79	56	6	36	71	45	90
4	37	19	94	76	4	50	87	58	31,07
2	52	37	16,08	95	2	64	30,03	70	24
0	68	56	23	21,15	0	78	19	83	42
0,9728	84	75	38	35	0,9618	92	35	95	60
6	99	93	52	54	6	25,05	52	24,09	78
4	17,15	21,12	67	74	4	19	68	21	95
2	30	31	82	94	2	32	84	34	32,12
0	45	49	96	22,13	0	46	31,00	47	30
0,9718	61	68	17,11	33	0,9608	59	16	59	48
6	76	86	25	52	6	73	31	71	63
4	92	22,05	40	72	4	86	47	84	81
2	18,07	23	55	91	2	26,00	63	96	98
0	22	41	69	23,10	0	13	78	25,08	33,14
0,9708	37	60	84	31	0,9598	26	94	21	31
6	52	78	98	50	6	39	32,09	33	48
4	67	96	18,12	69	4	52	24	45	64
2	83	23,14	26	88	2	65	39	56	81
0	98	32	41	24,07	0	78	54	68	96
0,9698	19,13	50	55	26	0,9588	92	69	80	34,13
6	28	68	69	45	6	27,04	84	92	29
4	43	86	83	64	4	17	99	26,04	46
2	58	24,04	97	83	2	30	33,14	16	62
0	73	22	19,12	25,02	0	43	29	27	79
0,9688	88	40	26	21	0,9578	55	44	39	95
6	20,03	57	39	40	6	68	59	51	35,11
4	18	75	53	59	4	81	73	62	26
2	33	93	68	77	2	94	88	74	43
0	47	25,11	82	96	0	28,06	34,03	86	59
0,9678	62	28	95	26,15	0,9568	19	17	97	75
6	77	46	20,09	34	6	31	31	27,08	90
4	92	64	24	53	4	43	45	19	36,06
2	21,07	81	37	72	2	56	60	31	22
0	21	99	51	91	0	68	74	42	37
0,9668	36	26,16	65	27,09	0,9558	80	88	53	53
6	50	34	79	28	6	93	35,02	64	68

Продолжение таблицы 5.5.-1.

Плотность ρ_{20}	Содержание этанола в водно-спиртовом растворе				Плотность ρ_{20}	Содержание этанола в водно-спиртовом растворе			
	в процентах		граммов в 100 мл при 20^{0}C	миллилитров в 100 г при взвешивании в воздухе		в процентах		граммов в 100 мл при 20^{0}C	миллилитров в 100 г при взвешивании в воздухе
	по массе	по объему				по массе	по объему		
4	29,05	16	75	84	4	29	23	33	76
2	17	30	86	99	2	40	35	43	90
0	29	44	97	37,15	0	50	46	51	45,03
0,9548	41	58	28,07	30	0,9438	61	58	61	17
6	53	72	19	46	6	71	70	70	30
4	65	85	30	51	4	82	82	80	44
2	77	99	41	76	2	93	94	89	58
0	89	36,13	52	92	0	36,03	43,05	98	71
0,9538	30,01	26	62	38,06	0,9428	13	17	34,07	84
6	13	40	73	21	6	24	28	16	97
4	25	53	83	36	4	34	39	25	46,10
2	36	67	94	51	2	45	51	34	23
0	48	80	29,05	66	0	55	62	43	36
0,9528	60	94	16	81	0,9418	65	74	52	49
6	72	37,07	26	96	6	76	85	61	62
4	84	20	36	39,10	4	86	97	70	75
2	95	34	47	25	2	96	44.08	79	88
0	31,07	47	57	40	0	37,07	19	88	47,01
0,9518	18	60	68	55	0,9408	17	30	96	14
6	30	73	78	69	6	27	42	35,06	27
4	41	86	88	84	4	37	53	15	41
2	53	99	98	98	2	47	64	23	53
0	64	38,12	30,09	40,12	0	58	75	32	66
0,9508	76	25	19	27	0,9398	68	86	41	79
6	87	38	29	42	6	78	98	50	93
4	99	51	39	56	4	88	45,09	59	48,06
2	32,10	64	50	70	2	98	20	68	18
0	21	77	60	85	0	38,09	31	76	31
0,9498	33	90	70	41,00	0,9388	19	42	85	43
6	44	39,03	81	14	6	29	53	94	56
4	55	15	90	28	4	39	64	36,02	69
2	66	28	31,00	42	2	49	75	11	82
0	78	40	10	56	0	59	86	20	95
0,9488	89	53	31,20	71	0,9378	69	97	28	49,07
6	33,00	66	30	86	6	79	46,08	37	20
4	11	78	40	99	4	89	19	46	33
2	22	91	50	42,14	2	99	30	54	46
0	33	40,04	60	28	0	39,09	41	63	58
0,9478	44	16	70	42	0,9368	19	52	72	71
6	55	28	79	56	6	29	63	80	84
4	66	41	89	70	4	39	73	88	96
2	77	53	99	84	2	49	84	97	50,08
0	88	65	32,08	98	0	59	95	37,06	21
0,9468	99	78	18	43,12	0,9358	69	47,06	14	34
6	34,10	90	28	26	6	79	17	23	47
4	21	41,02	38	39	4	89	27	31	59
2	32	15	48	54	2	99	38	40	72
0	43	27	57	68	0	40,09	49	48	85
0,9458	54	39	67	81	0,9348	19	59	56	97
6	65	51	76	95	6	29	70	65	51,10
4	76	63	86	44,08	4	38	81	73	22
2	86	75	95	22	2	48	92	82	35
0	97	87	33,05	35	0	58	48,02	90	47
0,9448	35,08	99	14	49	0,9338	68	13	99	60
6	19	42,11	24	63	6	78	23	38,07	72

Продолжение таблицы 5.5.-1.

Плотность ρ_{20}	Содержание этанола в водно-спиртовом растворе				Плотность ρ_{20}	Содержание этанола в водно-спиртовом растворе			
	в процентах		граммов в 100 мл при 20^0C	миллилитров в 100 г при взвешивании в воздухе		в процентах		граммов в 100 мл при 20^0C	миллилитров в 100 г при взвешивании в воздухе
	по массе	по объему				по массе	по объему		
4	88	33	15	84	4	09	86	51	46
2	98	44	23	97	2	18	96	59	58
0	41,07	54	31	52,09	0	28	54,06	67	70
0,9328	17	65	40	22	0,9218	37	15	74	81
6	27	75	48	34	6	46	25	82	93
4	36	86	56	46	4	55	34	89	59,05
2	46	96	64	58	2	65	44	97	17
0	56	49,07	73	71	0	74	54	43,05	29
0,9318	65	17	81	83	0,9208	83	63	12	40
6	75	27	89	95	6	92	73	20	52
4	85	38	97	53,08	4	47,01	82	27	63
2	94	48	39,05	20	2	10	92	35	75
0	42,04	58	13	32	0	20	55,01	42	86
0,9308	13	69	22	45	0,9198	29	11	50	98
6	23	79	30	56	6	38	20	57	60,10
4	33	89	38	68	4	47	30	65	22
2	42	99	46	80	2	56	39	72	33
0	52	50,10	54	93	0	65	48	79	44
0,9298	61	20	62	54,05	0,9188	74	58	87	56
6	71	30	70	17	6	83	67	94	67
4	80	40	78	29	4	93	77	44,02	79
2	90	50	86	41	2	48,02	86	09	91
0	43,00	60	94	53	0	11	95	16	61,02
0,9288	09	71	40,02	66	0,9178	20	56,05	24	14
6	18	81	10	78	6	29	14	31	25
4	28	91	18	90	4	38	23	38	37
2	37	51,01	26	55,02	2	47	33	46	49
0	47	11	34	14	0	56	42	53	60
0,9278	56	21	42	26	0,9168	65	51	60	71
6	66	31	50	38	6	75	61	68	83
4	75	41	58	50	4	84	70	75	95
2	85	51	66	62	2	93	79	82	62,06
0	94	61	73	74	0	49,02	89	90	18
0,9268	44,04	71	81	86	0,9158	11	98	97	29
6	13	81	89	98	6	20	57,07	45,04	40
4	23	91	97	56,10	4	29	17	12	53
2	32	52,00	41,04	21	2	38	26	19	64
0	41	10	12	33	0	47	35	26	76
0,9258	51	20	20	45	0,9148	56	44	34	87
6	60	30	28	57	6	65	53	41	98
4	70	40	36	69	4	74	62	48	63,09
2	79	50	44	81	2	83	72	56	21
0	88	60	52	93	0	92	81	63	32
0,9248	98	69	59	57,04	0,9138	50,01	90	70	44
6	45,07	79	67	16	6	10	99	77	55
4	16	89	74	28	4	19	58,08	84	66
2	26	99	82	40	2	28	17	91	77
0	35	53,09	90	52	0	37	26	98	89
0,9238	44	18	97	63	0,9128	46	35	46,05	64,00
6	53	28	42,05	75	6	55	44	12	11
4	63	38	13	88	4	64	54	20	23
2	72	48	21	58,00	2	73	63	27	35
0	81	57	28	11	0	82	72	35	46
0,9228	91	67	36	23	0,9118	91	81	42	57
6	46,00	77	44	35	6	51,00	90	49	68

Продолжение таблицы 5.5.-1.

Плотность ρ_{20}	Содержание этанола в водно-спиртовом растворе				Плотность ρ_{20}	Содержание этанола в водно-спиртовом растворе			
	в процентах		граммов в 100 мл при 20°С	миллилитров в 100 г при взвешивании в воздухе		в процентах		граммов в 100 мл при 20°С	миллилитров в 100 г при взвешивании в воздухе
	по массе	по объему				по массе	по объему		
4	09	99	56	80	4	95	82	37	97
2	18	59,08	63	91	2	56,03	91	44	71,08
0	27	17	70	65,02	0	12	64,00	51	20
0,9108	36	26	77	14	0,8998	21	08	58	30
6	45	35	84	25	6	30	17	65	42
4	54	44	91	36	4	38	25	71	53
2	63	53	99	48	2	47	34	78	64
0	71	62	47,06	59	0	56	42	84	75
0,9098	80	71	13	70	0,8988	65	51	92	86
6	89	80	20	82	6	73	59	99	97
4	98	89	27	93	4	82	68	51,05	72,08
2	52,07	98	34	66,05	2	91	76	11	19
0	16	60,07	41	16	0	57,00	85	18	30
0,9088	25	16	48	27	0,8978	08	93	25	41
6	34	25	55	39	6	17	65,02	32	53
4	43	34	62	50	4	26	10	38	63
2	52	43	70	61	2	34	18	44	73
0	60	52	77	72	0	43	27	52	85
0,9078	69	60	83	83	0,8968	52	35	58	96
6	78	69	90	95	6	60	43	64	73,06
4	87	78	97	67,06	4	69	52	71	18
2	96	87	48,04	17	2	78	61	78	30
0	53,05	96	11	29	0	87	69	85	41
0,9068	14	61,05	18	41	0,8958	95	77	91	51
6	22	14	26	52	6	58,04	86	99	63
4	31	22	32	62	4	13	94	52,05	73
2	40	31	39	73	2	21	66,02	11	84
0	49	40	46	85	0	30	11	18	95
0,9058	58	49	53	97	0,8948	39	19	24	74,06
6	67	57	60	68,07	6	47	27	30	17
4	75	66	67	19	4	56	36	38	29
2	84	75	74	30	2	65	44	44	39
0	93	84	81	41	0	74	53	51	51
0,9048	54,02	92	87	52	0,8938	82	61	57	61
6	11	62,01	94	63	6	91	69	64	72
4	19	10	49,01	75	4	59,00	77	70	83
2	28	19	08	87	2	08	86	77	95
0	37	27	15	96	0	17	94	83	75,05
0,9038	46	36	22	69,08	0,8928	26	67,02	90	16
6	54	45	29	19	6	34	11	97	27
4	63	53	35	30	4	43	19	53,03	39
2	72	62	42	42	2	52	27	09	49
0	81	71	50	53	0	60	36	17	61
0,9028	89	79	56	63	0,8918	69	44	23	72
6	98	88	63	74	6	77	52	29	83
4	55,07	97	70	86	4	86	61	36	94
2	16	63,05	76	97	2	95	69	43	76,05
0	25	14	83	70,08	0	60,03	77	49	15
0,9018	33	22	90	19	0,8908	12	85	55	26
6	42	31	97	30	6	21	94	62	38
4	51	40	50,04	42	4	29	68,02	69	49
2	60	48	10	52	2	38	10	75	59
0	68	57	17	64	0	47	18	81	70
0,9008	77	65	24	75	0,8898	55	26	88	81
6	86	74	31	86	6	64	35	95	93

Продолжение таблицы 5.5.-1.

Плотность ρ20	Содержание этанола в водно-спиртовом растворе				Плотность ρ20	Содержание этанола в водно-спиртовом растворе			
	в процентах		граммов в 100 мл при 20^{0}С	миллилитров в 100 г при взвешивании в воздухе		в процентах		граммов в 100 мл при 20^{0}С	миллилитров в 100 г при взвешивании в воздухе
	по массе	по объему				по массе	по объему		
4	72	43	54,01	77,04	4	44	83	48	83,01
2	81	51	07	14	2	52	91	55	12
0	90	59	14	25	0	61	98	60	22
0,8888	98	67	20	36	0,8778	69	73,06	66	33
6	61,07	75	26	47	6	78	14	73	45
4	15	83	33	57	4	86	22	79	56
2	24	91	39	68	2	95	29	85	66
0	33	69,00	46	80	0	66,03	37	91	77
0,8878	41	08	52	91	0,8768	12	45	97	87
6	50	16	59	78,02	6	20	53	58,03	98
4	58	24	65	12	4	29	60	09	84,08
2	67	32	71	23	2	37	68	15	19
0	76	40	78	34	0	46	76	22	30
0,8868	84	48	84	45	0,8758	54	84	28	42
6	93	56	90	56	6	63	91	33	51
4	62,01	64	96	66	4	71	99	40	63
2	10	72	55,03	77	2	80	74,07	46	74
0	18	80	09	88	0	88	15	52	85
0,8858	27	88	15	99	0,8748	97	22	58	95
6	36	96	22	79,10	6	67,05	30	64	85,06
4	44	70,05	29	21	4	14	37	70	16
2	53	12	34	31	2	22	45	76	27
0	61	20	41	42	0	31	53	82	38
0,8848	70	28	47	53	0,8738	39	61	89	49
6	79	36	53	64	6	47	68	94	59
4	87	45	60	75	4	56	76	59,01	70
2	96	53	67	86	2	64	84	07	81
0	63,04	61	73	97	0	73	91	12	91
0,8838	13	69	79	80,08	0,8728	81	99	19	86,03
6	21	77	86	19	6	90	75,06	24	12
4	30	85	92	30	4	98	14	31	24
2	39	93	98	40	2	68,07	22	37	35
0	47	71,01	56,05	51	0	15	29	42	45
0,8828	56	09	11	62	0,8718	24	37	49	56
6	64	17	17	73	6	32	45	55	67
4	73	25	24	84	4	41	52	61	77
2	82	33	30	95	2	49	60	67	89
0	90	41	36	81,06	0	58	68	73	87,00
0,8818	99	49	42	17	0,8708	66	75	79	10
6	64,07	57	49	28	6	75	83	85	21
4	16	65	55	39	4	83	90	91	31
2	24	72	61	49	2	92	98	97	42
0	33	80	67	60	0	69,00	76,06	60,03	53
0,8808	41	88	73	70	0,8698	08	13	09	63
6	50	96	80	81	6	17	21	15	74
4	59	72,04	86	93	4	25	28	21	85
2	67	12	92	82,04	2	34	36	27	96
0	76	20	99	15	0	42	43	32	88,06
0,8798	84	28	57,05	25	0,8688	51	51	39	17
6	93	36	11	36	6	59	58	44	27
4	65,01	44	17	47	4	68	66	51	38
2	10	51	23	57	2	76	74	57	50
0	18	59	29	68	0	84	81	62	60
0,8788	27	67	36	79	0,8678	93	89	69	71
6	35	75	42	90	6	70,01	96	74	81

Продолжение таблицы 5.5.-1.

Плотность ρ_{20}	Содержание этанола в водно-спиртовом растворе				Плотность ρ_{20}	Содержание этанола в водно-спиртовом растворе			
	в процентах		граммов в 100 мл при 20^{0}С	миллилитров в 100 г при взвешивании в воздухе		в процентах		граммов в 100 мл при 20^{0}С	миллилитров в 100 г при взвешивании в воздухе
	по массе	по объему				по массе	по объему		
4	10	77,04	81	93	4	69	81,05	97	76
2	18	11	86	89,02	2	78	12	64,03	87
0	26	19	92	14	0	86	19	08	97
0,8668	35	26	98	24	0,8558	94	26	14	95,07
6	43	33	61,03	34	6	75,02	33	19	17
4	52	41	10	46	4	11	40	25	28
2	60	48	15	56	2	19	47	30	38
0	68	56	22	67	0	27	54	36	49
0,8658	77	63	27	77	0,8548	35	61	41	59
6	85	70	33	88	6	44	68	47	70
4	94	78	39	99	4	52	75	52	80
2	71,02	85	44	90,09	2	60	82	58	90
0	10	93	51	21	0	69	89	63	96,01
0,8648	19	78,00	61,56	31	0,8538	77	96	68	11
6	27	07	62	41	6	85	82,03	74	21
4	36	15	68	53	4	93	10	80	32
2	44	22	74	63	2	76,01	17	85	43
0	52	29	79	73	0	10	24	91	53
0,8638	61	37	86	84	0,8528	18	31	64,96	63
6	69	44	91	95	6	26	38	65,02	74
4	7	51	97	91,05	4	35	45	08	85
2	86	59	62,03	16	2	43	52	13	95
0	94	66	08	26	0	51	59	19	97,06
0,8628	72,03	73	14	36	0,8518	59	66	24	16
6	11	81	20	47	6	67	73	30	27
4	19	88	26	57	4	76	80	35	38
2	28	95	31	68	2	84	87	41	48
0	37	79,03	38	79	0	92	94	46	59
0,8618	44	10	43	90	0,8508	77,00	83,01	52	69
6	53	17	49	92,00	6	09	08	57	80
4	61	24	54	10	4	17	14	62	89
2	69	32	60	22	2	25	21	68	99
0	78	39	66	32	0	33	28	73	98,10
0,8608	86	46	72	42	0,8498	42	35	79	20
6	95	53	77	52	6	50	42	84	31
4	73,03	61	83	64	4	58	49	90	42
2	11	68	89	74	2	66	56	95	53
0	20	75	94	84	0	74	63	66,01	63
0,8598	28	83	63,01	96	0,8488	83	69	05	73
6	36	90	06	93,06	6	91	76	11	83
4	45	97	12	16	4	99	83	16	93
2	53	80,04	17	27	2	78,07	90	22	99,04
0	61	11	23	37	0	16	97	28	15
0,8588	70	19	29	49	0,8478	24	84,04	33	25
6	78	26	35	59	6	32	10	38	34
4	86	33	40	70	4	40	17	43	45
2	95	40	46	80	2	48	24	49	56
0	74,03	47	51	90	0	56	31	54	67
0,8578	11	54	57	94,01	0,8468	64	38	60	78
6	20	62	63	13	6	73	44	65	87
4	28	69	69	23	4	81	51	70	98
2	36	76	74	33	2	89	58	76	100,08
0	44	83	80	43	0	97	65	81	19
0,8568	53	90	85	54	0,8458	79,05	71	86	28
6	61	97	91	64	6	13	78	91	39

Продолжение таблицы 5.5.-1.

Плотность ρ_{20}	Содержание этанола в водно-спиртовом растворе				Плотность ρ_{20}	Содержание этанола в водно-спиртовом растворе			
	в процентах		граммов в 100 мл при 20^{0}C	миллилитров в 100 г при взвешивании в воздухе		в процентах		граммов в 100 мл при 20^{0}C	миллилитров в 100 г при взвешивании в воздухе
	по массе	по объему				по массе	по объему		
4	22	85	97	50	4	64	42	79	10
2	30	91	67,02	60	2	72	48	83	20
0	38	98	07	70	0	80	54	88	30
0,8448	46	85,05	13	80	0,8338	88	61	94	42
6	54	12	18	91	6	96	67	98	51
4	62	18	23	101,01	4	84,04	73	70,03	61
2	70	25	29	12	2	11	79	08	70
0	78	32	34	23	0	19	86	13	82
0,8438	87	38	39	32	0,8328	27	92	18	91
6	95	45	44	42	6	35	98	23	107,01
4	80,03	51	49	52	4	43	89,04	28	10
2	11	58	55	63	2	51	10	32	20
0	19	65	60	74	0	59	16	37	30
0,8428	27	71	65	83	0,8318	67	23	43	42
6	35	78	70	94	6	74	29	47	52
4	43	85	76	102,04	4	82	35	52	61
2	51	91	81	14	2	90	41	57	71
0	60	98	86	25	0	98	47	62	80
0,8418	68	86,05	92	36	0,8308	85,06	53	66	91
6	76	11	96	45	6	14	59	71	108,00
4	84	18	68,02	56	4	21	65	76	10
2	92	24	07	65	2	29	71	81	20
0	81,00	31	12	76	0	37	77	85	29
0,8408	08	86,37	17	85	0,8298	45	83	90	39
6	16	44	22	96	6	53	90	96	51
4	24	50	27	103,-6	4	61	96	71,00	61
2	32	57	33	17	2	68	90,02	05	70
0	40	63	37	26	0	76	08	10	81
0,8398	48	70	43	37	0,8288	84	14	14	90
6	56	76	48	47	6	92	20	19	109,00
4	64	83	53	58	4	86,00	26	24	10
2	72	89	58	67	2	07	32	29	20
0	80	96	63	78	0	15	38	33	30
0,8388	88	87,02	68	87	0,8278	23	43	37	38
6	96	09	74	98	6	31	49	42	48
4	82,04	15	78	104,08	4	38	55	47	58
2	12	21	83	18	2	46	61	52	68
0	20	28	89	29	0	54	67	56	78
0,8378	28	34	93	38	0,8268	62	73	61	88
6	36	41	99	49	6	69	79	66	98
4	44	47	69,04	59	4	77	85	71	110,08
2	52	53	08	68	2	85	91	75	18
0	60	60	14	79	0	93	97	80	28
0,8368	68	66	19	89	0,8258	87,00	91,03	85	38
6	76	72	23	98	6	08	09	89	48
4	84	79	29	105,09	4	16	15	94	58
2	92	85	34	19	2	24	20	98	66
0	83,00	92	39	30	0	31	26	72,03	76
0,8358	08	98	44	40	0,8248	39	32	08	86
6	16	88,04	49	49	6	47	38	12	96
4	24	11	54	61	4	54	44	18	111,06
2	32	17	59	70	2	62	50	23	16
0	40	23	64	80	0	70	55	27	25
0,8348	48	29	68	89	0,8238	78	61	32	35
6	56	36	74	106,01	6	85	67	36	45

Продолжение таблицы 5.5.-1.

Плотность ρ_{20}	Содержание этанола в водно-спиртовом растворе				Плотность ρ_{20}	Содержание этанола в водно-спиртовом растворе			
	в процентах		граммов в 100 мл при 20^{0}С	миллилитров в 100 г при взвешивании в воздухе		в процентах		граммов в 100 мл при 20^{0}С	миллилитров в 100 г при взвешивании в воздухе
	по массе	по объему				по массе	по объему		
4	93	73	41	55	4	92,05	75	78	78
2	88,01	79	45	65	2	13	80	82	87
0	08	85	50	75	0	20	85	86	96
0,8228	16	90	53	83	0,8118	27	91	91	117,07
6	24	96	58	93	6	35	96	95	16
4	31	92,02	63	112,03	4	42	95,01	99	25
2	39	08	68	14	2	49	06	75,03	34
0	47	13	72	22	0	56	11	07	43
0,8218	54	19	76	32	0,8108	64	16	11	52
6	62	25	81	42	6	71	21	15	61
4	69	30	85	51	4	78	26	19	70
2	77	36	90	61	2	85	31	22	80
0	85	42	94	71	0	93	36	26	89
0,8208	92	47	98	81	0,8098	93,00	41	30	98
6	89,00	53	73,03	91	6	07	46	34	118,07
4	08	58	07	113,00	4	14	52	39	18
2	15	64	12	10	2	22	57	43	27
0	23	70	17	20	0	29	62	47	36
0,8198	30	75	20	29	0,8088	36	67	51	45
6	38	81	25	39	6	43	72	55	54
4	45	87	30	49	4	50	77	59	63
2	53	92	34	58	2	58	82	63	73
0	60	98	39	68	0	65	87	67	82
0,8188	68	93,04	43	78	0,8078	72	92	71	91
6	75	09	47	86	6	79	97	75	119,00
4	83	14	51	95	4	86	96,02	79	09
2	91	20	56	114,06	2	94	07	83	18
0	98	25	60	15	0	94,01	12	86	27
0,8178	90,06	31	65	25	0,8068	08	16	90	35
6	13	36	69	33	6	15	21	94	44
4	21	42	73	44	4	22	26	98	53
2	28	47	77	53	2	29	31	76,02	63
0	35	53	82	63	0	36	36	05	72
0,8168	90,43	58	86	72	0,8058	43	41	09	81
6	50	63	90	80	6	50	45	13	89
4	58	69	95	91	4	57	50	16	98
2	65	74	99	115,00	2	65	55	20	120,08
0	73	80	74,03	10	0	72	60	24	17
0,8158	80	85	07	19	0,8048	79	65	28	26
6	88	91	12	30	6	86	70	32	35
4	95	96	16	38	4	93	74	35	43
2	91,03	94,02	21	49	2	95,00	79	39	52
0	10	07	25	58	0	07	84	43	61
0,8148	17	12	29	67	0,8038	14	89	47	70
6	25	17	33	76	6	21	94	51	80
4	32	23	37	86	4	28	99	55	89
2	39	28	41	95	2	35	97,03	58	97
0	47	33	45	116,03	0	42	08	62	121,06
0,8138	54	38	49	12	0,8028	49	12	65	14
6	61	43	53	21	6	56	17	69	23
4	69	49	58	32	4	63	22	74	33
2	76	54	62	41	2	70	26	77	40
0	83	59	66	50	0	77	31	81	50
0,8128	91	64	70	59	0,8018	84	35	85	58
6	98	70	74	70	6	91	40	88	67

Продолжение таблицы 5.5.-1.

Плотность ρ_{20}	Содержание этанола в водно-спиртовом растворе				Плотность ρ_{20}	Содержание этанола в водно-спиртовом растворе			
	в процентах		граммов в 100 мл при 20^{0}С	миллилитров в 100 г при взвешивании в воздухе		в процентах		граммов в 100 мл при 20^{0}С	миллилитров в 100 г при взвешивании в воздухе
	по массе	по объему				по массе	по объему		
4	98	44	92	75	2	08	81	78,00	43
2	96,04	49	96	84	0	14	85	03	51
0	11	54	77,00	94	0,7948	21	89	06	59
0,8008	18	58	03	122,01	6	27	94	09	69
6	25	63	07	11	4	34	98	12	77
4	32	67	10	19	2	41	99,02	15	85
2	39	72	14	29	0	47	06	19	93
0	46	76	17	36	0,7938	54	10	22	125,02
0,7998	52	81	21	46	6	60	14	25	10
6	59	86	25	55	4	67	18	28	18
4	66	90	28	63	2	74	22	31	26
2	73	95	32	72	0	80	26	34	34
0	80	99	35	80	0,7928	87	30	78,37	43
0,7988	87	98,04	38	90	6	93	34	41	51
6	93	08	41	98	4	99,00	38	44	59
4	97,00	12	44	123,06	2	06	42	47	67
2	07	17	48	16	0	13	46	50	75
0	14	21	53	24	0,7918	19	50	53	84
0,7978	20	25	56	32	6	26	54	56	92
6	27	29	59	40	4	32	58	60	126,01
4	34	34	63	50	2	38	62	63	09
2	41	38	66	58	0	45	66	66	17
0	47	42	69	66	0,7908	51	99,70	69	25
0,7968	54	47	73	76	6	58	74	72	33
6	61	51	76	84	4	64	78	75	42
4	67	55	79	92	2	70	82	78	50
2	74	59	83	99	0	77	86	82	58
0	81	64	86	124,09	0,7898	83	89	84	64
0,7958	88	68	90	17	6	89	93	87	72
6	94	72	93	25	4	96	97	90	81
4	98,01	77	97	35	0,78927	100,00	100,00	78,93	87

Таблица 5.5.-2

Количество (в граммах при температуре 20^0С) воды и спирта разной концентрации, которые необходимо смешать, чтобы получить 1 кг спирта концентрации 30%, 40, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% и 92 %

Крепость взятого спирта, %	30 %		40 %		50 %		60 %		70 %		80 %		90 %		92 %	
	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода
96	262	738	355	645	452	548	555	445	665	335	783	217	913	87	941	59
95	266	734	360	640	459	541	564	436	675	325	795	205	927	73	955	45
94	270	730	366	634	466	534	572	428	686	314	807	193	941	59	970	30
93	275	725	371	629	473	527	681	419	696	304	820	180	956	44	985	15
92	279	721	377	623	481	519	590	410	707	293	832	168	970	30		
91	283	717	383	617	488	512	599	401	717	283	845	155	985	15		
90	287	713	389	611	495	505	608	392	728	272	858	142				
89	292	708	395	605	503	497	617	383	739	261	871	129				
88	296	704	401	599	511	489	627	373	751	249	884	116				
87	301	699	407	593	518	482	636	364	762	238	898	102				
86	305	695	413	587	526	474	646	354	774	226	911	89				
85	310	690	419	581	534	466	656	344	786	214	925	75				
84	315	685	426	574	543	457	666	334	798	202	940	60				
83	320	680	432	568	551	449	676	324	810	190	954	46				
82	325	675	439	561	560	440	687	313	823	177	969	31				
81	330	670	446	554	568	432	698	302	836	164	984	16				
80	335	665	453	547	577	423	709	291	849	151						
79	340	660	460	540	587	413	720	280	863	137						
78	346	654	468	532	596	404	732	268	876	124						
77	351	649	475	525	605	395	743	257	890	110						
76	357	643	483	517	615	385	755	245	905	95						
75	363	637	491	509	625	375	768	232	920	80						
74	369	631	499	501	636	364	781	219	935	65						
73	375	625	507	493	646	354	794	206	951	49						
72	381	619	516	484	657	343	807	193	967	33						
71	388	612	525	475	669	331	821	179	983	17						
70	394	606	534	466	680	320	835	165								
69	401	599	543	457	692	308	849	151								
68	408	592	553	447	704	296	864	136								
67	416	584	562	438	716	284	879	121								
66	423	577	572	428	729	271	895	105								
65	431	569	583	417	742	258	911	89								

Продолжение таблицы 5.5.-2

Концентрация взятого спирта, %	30 %		40 %		50 %		60 %		70 %		80 %		90 %		92 %	
	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода
64	438	562	593	407	756	244	928	72								
63	447	553	604	396	770	230	945	55								
62	455	545	616	384	784	216	963	37								
61	464	536	627	373	799	201	981	19								
60	472	528	639	361	815	185										
59	482	518	652	348	830	170										
58	491	509	665	335	847	153										
57	501	499	678	322	864	136										
56	511	489	692	308	881	119										
55	522	478	706	294	899	101										
54	532	468	720	280	918	82										
53	544	456	736	264	937	63										
52	555	445	751	249	958	42										
51	567	433	768	232	978	22										
50	580	420	785	215												
49	593	407	803	197												
48	607	393	821	179												
47	621	379	840	160												
46	636	364	860	140												
45	651	349	881	119												
44	667	333	902	98												
43	684	316	925	75												
42	701	299	949	51												
41	720	280	974	26												
40	739	261														
39	759	241														
38	781	219														
37	803	197														
36	826	174														
35	851	149														
34	878	122														
33	905	95														
32	935	65														

Таблица 5.5.-3

Количество (в миллилитрах при 20^{0}С) воды и спирта различной концентрации, которые необходимо смешать, чтобы получить 1 л спирта концентрации 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 % , 85 %, 90 %

Концентрация взятого спирта, %	30 %		35 %		40 %		45 %		50 %		55 %		60 %		65 %	
	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода
95	316	707	368	658	421	607	474	556	526	504	579	451	632	397	684	343
90	333	687	389	634	444	581	500	526	556	470	611	414	667	357	722	299
85	353	665	412	609	471	551	529	493	588	434	647	374	706	313	765	252
80	375	641	438	581	500	519	562	457	625	394	688	330	750	265	812	200
75	400	614	467	549	533	483	600	417	667	349	733	280	800	211	867	141
70	429	584	500	514	571	443	643	371	714	298	786	225	857	150	929	76
65	462	549	538	473	615	396	692	319	769	240	846	161	923	81		
60	500	509	583	426	667	343	750	258	833	173	916	87				
55	545	462	636	371	727	279	818	187	909	94						
50	600	405	700	305	800	204	900	103								
45	667	336	778	225	889	113										
40	750	252	875	126												
35	857	143														

Продолжение таблицы 5.5.-3

Концентрация взятого спирта, %	70 %		75 %		80 %		85 %		90 %	
	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода
95	737	288	789	233	842	176	895	119	947	61
90	778	240	833	182	889	122	944	62		
85	824	190	882	127	941	64				
80	875	134	938	67						
75	933	71								
70										
65										
60										
55										
50										
45										
40										
35										

Таблица 5.5.-4

Количество (в миллилитрах при 20^{0}С) воды и спирта различной концентрации, которые необходимо смешать, чтобы получить 1 л (при 20^{0}С) спирта концентрации 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %

Концентрация взятого спирта, %	30 %		35 %		40 %		45 %		50 %		55 %		60 %		65 %	
	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода
96,5	310,9	713,1	362,7	664,7	414,5	615,3	466,3	565,0	518,1	513,8	569,9	461,8	621,8	409,1	673,6	355,8
96,4	311,2	712.7	363,1	664,2	414,9	614,8	466,8	564,4	518,7	513,1	570,5	461,1	622,4	408,3	674,3	354,9
96,3	311,5	712,3	363,4	663,8	415,4	614,3	467,3	563,8	519,2	512,5	571,1	460,4	623,1	407,6	675,0	354,1
96,2	311,9	712,0	363,8	663,3	415,8	613,7	467,8	563,2	519,8	511,8	571,7	459,7	623,7	406,8	675,7	353,2
96,1	312,2	711,6	364,2	662,9	416,2	613,2	468,2	562,6	520,3	511,2	572,3	458,9	624,3	406,0	676,4	352,4
96,0	312,5	711,2	364,6	662,4	416,7	612,7	468,8	562,0	520,8	510,5	572,9	458,2	625,0	405,2	677,1	351,5
95,9	312,8	710,8	365,0	662,0	417,1	612,2	469,2	561,5	521,4	509,9	573,5	457,5	625,7	404,4	677,8	350,7
95,8	313,2	710,4	365,3	661,5	417,5	611,7	469,7	560,9	521,9	509,2	574,1	456,8	626,3	403,7	678,5	349,8
95,7	313,5	710,0	365,7	661,1	418,0	611,1	470,2	560,3	522,5	508,6	574,7	456,1	627,0	402,9	679,2	349,0
95,6	313,8	709,6	366,1	660,6	418,4	610,6	470,7	559,7	523,0	507,9	575,3	455,4	627,6	402,1	679,9	348,2
95,5	314,1	709,2	366,5	660,1	418,8	610,1	471,2	559,1	523,6	507,3	575,9	454,7	628,3	401,3	680,6	347,3
95,4	314,5	708,8	366,9	659,7	419,3	609,6	471,7	558,5	524,1	506,6	576,5	453,9	628,9	400,5	681,3	346,5
95,3	314,8	708,4	367,3	659,2	419,7	609,1	472,2	558,0	524,7	506,0	577,1	453,2	629,6	399,7	682,1	345,6
95,2	315,1	708,0	367,6	658,8	420,2	608,5	472,7	557,4	525,2	505,3	577,7	452,5	630,3	399,0	682,8	344,8
95,1	315,5	707,6	368,0	658,3	420,6	608,0	473,2	556,8	525,8	504,7	578,3	451,8	630,9	398,2	683,5	343,9

Продолжение таблицы 5.5.-4

Концентрация взятого спирта, %	70 %		75 %		80 %		85 %		90 %		95 %	
	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода
96,5	725,4	301,8	777,2	247,2	829,0	192,0	880,8	135,8	932,6	78,2	984,5	18,6
96,4	726,1	300,9	778,0	246,3	829,9	190,9	881,7	134,7	933,6	77,1	985,5	17,3
96.3	726,9	300,0	778,8	245,3	830,7	189,9	882,7	133,6	934,6	75,9	986,5	16,1
96,2	727,7	299,1	779,6	244,3	831,6	188,8	883,6	132,4	935,6	74,7	987,5	14,9
96,1	728,4	298,2	780,4	243,3	832,5	187,8	884,5	131,3	936,5	73,6	988,6	13,6
96,0	729,2	297,2	781,3	242,4	833,3	186,8	885,4	130,2	937,5	72,4	989,6	12,4
95,9	729,9	296,3	782,1	241,4	834,2	185,7	886,3	129,1	938,5	71,2	990,6	11,2
95,8	730,7	295,4	782,9	240,4	835,1	184,7	887,3	128,0	939,5	70,0	991,6	9,9
95,7	731.5	294,5	783,7	239,4	835,9	183,6	888,2	126,9	940,4	68,9	992,7	8,7
95,6	732,2	293,6	784,5	238,5	836,8	182,6	889,1	125,8	941,4	67,7	993,7	7,5
95,5	733,0	292,7	785,3	237,5	837,7	181,6	890,1	124,7	942,4	66,5	994,8	6,2
95,4	733,7	291,8	786,2	236,5	838,6	180,5	891,0	123,6	943,4	65,4	995,8	5,0
95,3	734,5	290,9	787,0	235,5	839,5	179,5	891,9	122,5	944,4	64,2	996,8	3,7
95,2	735,3	290,0	787,8	234,5	840,3	178,4	892,9	121,4	945,4	63,0	997,9	2,5
95,1	736,1	289,0	788,6	233,6	841,2	177,4	893,8	120,3	946,4	61,8	998,9	1,3

Таблица 5.5.-5

Таблица для получения спирта различной концентрации при 20^{0}С

Концентрация разводимого спирта (1000 объемов), %	Желаемая концентрация разведенного спирта												
	30 %	35 %	40 %	45 %	50 %	55 %	60 %	65 %	70 %	75 %	80 %	85 %	90 %
35	167												
40	335	144											
45	505	290	127										
50	674	436	255	114									
55	845	583	384	229	103								
60	1017	730	514	344	207	95							
65	1189	878	644	460	311	190	88						
70	1360	1027	774	577	417	285	175	81					
75	1535	1177	906	694	523	382	264	163	76				
80	1709	1327	1039	812	630	480	353	246	153	72			
85	1884	1478	1172	932	738	578	443	329	231	144	68		
90	2061	1630	1306	1052	847	677	535	414	310	218	138	65	
95	2239	1785	1443	1174	957	779	629	501	391	295	209	133	64

Примечание. Цифра в месте пересечения горизонтальной и вертикальной строк указывает объем воды при 20^{0}С, который следует прилить к 1000 объемам спирта имеющейся концентрации при 20^{0}С, для получения разведения.

Таблица 5.5.-5

Количество (в миллилитрах при 20^{0}С) воды и спирта концентрации 96,6 % - 97,0 %, которые необходимо смешать, чтобы получить 1 л (при 20^{0}С) спирта концентрации 40 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %

Концентрация взятого спирта, %	40 %		70 %		80 %		90 %		95 %	
	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода
96,6	414,1	615,8	724,6	302,7	828,2	193,0	931,7	79,4	983,4	19,8
96,7	413,7	616,3	723,9	303,6	827,3	194,0	930,7	80,6	982,4	21,0
96,8	413,2	616,8	723,1	304,5	826,5	195,7	929,7	81,7	981,4	22,3
96,9	412,8	617,4	722,4	305,4	825,6	196,1	928,8	82,9	980,4	23,5
97,0	412,4	617,9	721,7	306,3	824,7	197,1	927,8	84,0	979,4	24,7

5.6. ОТЧЕТ ОБ ИССЛЕДОВАНИИ ИНТЕРФЕРОНОВ

Данный раздел публикуется для информации.

1. ВВЕДЕНИЕ

Частные статьи по интерферонам человека описывают главным образом исследования, основанные на ингибиторной активности интерферона в отношении цитопатического действия вируса в культуре клеток. Однако если она описывает более одного подкласса интерферона, то в большинстве случаев сам вирус, культура клеток и детали исследования не определены с точностью, необходимой для обеспечения достаточной вариабильности.
Данный текст представляет собой основную информацию для исследователя относительно того, как планировать, оптимизировать и валидировать подобные исследования после того, как будет определена комбинация культуры клеток и цитопатического вируса. Подробная процедура для цитопатического антивирусного анализа приводится в качестве примера подходящего метода наряду с информацией по другим комбинациям вирус-клеточная линия и руководством по адаптированию и валидированию данной процедуры для аналогичных комбинаций.

2. АНТИВИРУСНЫЕ (СНИЖАЮЩИЕ ЦИТОПАТИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ) ИССЛЕДОВАНИЯ.

Антивирусные исследования человеческих интерферонов основываются на индукции клеточной реакции в клетках человека, которая предотвращает или снижает цитопатический эффект инфекционного вируса. Сила действия интерферона оценивается путем сравнения его защитного эффекта против вирусного цитопатического эффекта с подобным эффектом соответствующего референтного препарата, калиброванного в Международных единицах.

3. ИССЛЕДОВАНИЕ ИНТЕРФЕРОНА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КЛЕТОК Hep2C и ВИРУСА ИНФЕКЦИОННОГО ЭНЦЕФАЛОМИОКАРДИТА

Данное антивирусное исследование интерферонов человека описывает цитопатический эффект редукционного типа. В нем используются клетки человека **Hep2c**, инфицированные вирусом энцефаломиокардита, для определения эффективности различных экспериментальных препаратов человеческого интерферона. Этот анализ использовался в трех международных исследованиях под эгидой Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) как вариант международных стандартов для человеческого интерферона альфа, человеческого интерферона бета и человеческого интерферона гамма и проявил себя как чувствительный, надежный и воспроизводимый метод для оценок эффективности различных типов человеческого интерферона.

Для культур клеток млекопитающих все процедуры выполняются с использованием стандартных операционных процедур по поддержанию клеточных линий в культуре. Объемы реагентов обозначены для клеточных культур, выполняемых в 75 см^2 колбах. Могут использоваться другие типы контейнеров, но при этом необходимо соответствующим образом откорректировать объем.

3.1. ХРАНЕНИЕ И ПОДГОТОВКА КЛЕТОК Hep 2c.

Клетки Hep2c содержатся и пересеваются в культуральной среде А. Клетки хранятся в замороженном виде с использованием стандартных операционных процедур. Растущие клетки могут пересеваться в культуре до 30 пассажей, после чего новую культуру получают из замороженного материала.

В начале исследования из колб берут клетки, образующие 90 % сплошной монослой, используя трипсиновую обработку, описанную ниже.

Из колб удаляют культуральную среду, затем в каждую колбу добавляют 5 мл раствора трипсина, нагретого до 37 С (раствор трипсина содержит 4 мг/мл *трипсина Р* и 4 мг/мл *натрия эделата Р).*

Непосредственно перед использованием раствор трипсина разводят 50 объемами фосфатного буфера. Колбу, закрытую пробкой, взбалтывают для промывки клеточного монослоя. Излишки трипсинового раствора убирают.

Колбы выдерживают 5-10 мин при температуре 37 С. Визуально или через микроскоп наблюдают за клетками на предмет появления признаков разделения. При наблюдении в микроскоп видно, как клетки округляются или разделяются и свободно плавают.

Энергично встряхивают колбы для разделения всех клеток, добавляют приблизительно 5 мл культуральной среды А, еще раз встряхивают для получения суспензии отдельных клеток.

При приготовлении суспензии для процедуры анализа необходимо тщательно разделить клетки с помощью пипетки, чтобы разрушить клеточные композиты. Подсчитывают количество клеток и ресуспендируют их в культуральной среде до концентрации $6 \cdot 10^5$ клеток/мл.

3.2. ВОСПРОИЗВЕДЕНИЕ ВИРУСА ЭНЦЕФАЛОМИОКАРДИТА

Вирус энцефаломиокардита (ЭМКВ) воспроизводится в культуре клеток мышей L-929. Клетки L-929 получают с использованием трипсинизации, как это описывалось для клеток Hep2c (*Примечание: при слабом росте клеток может возникнуть необходимость замены неонатальной телячьей сыворотки на эмбриональную коровью сыворотку*).

Берут несколько колб со сплошным монослоем культуры клеток L-929. Удаляют среду из колб. Добавляют 2 мл суспензии ЭМКВ, разбавленной в культуральной среде В таким образом, чтобы она содержала приблизительно $2{,}5 \cdot 10^8$ бляшкообразующих единиц (БОЕ) на миллилитр. Каждая колба должна содержать $4\text{-}6 \cdot 10^7$ L-929 клеток и, таким образом, инфекционность будет составлять 10 БОЕ/клетку. Осторожно взбалтывают вирусную суспензию, распределяя по клеточному монослою, и ставят колбы в термостат приблизительно на один час. Поддерживают pH среды от 7,4 до 7,8.

После адсорбции ЭМКВ, добавляют приблизительно 40 мл культуральной среды в каждую колбу и возвращают колбы в инкубатор с температурой 37°С приблизительно на 30 ч. Поддерживают pH среды от 7,4 до 7,8 с целью получения максимального количества вируса. По окончании инкубации удаляют культуральную жидкость и хранят её при температуре приблизительно 40 С.

Колбы охлаждают до температуры −20 С, чтобы заморозить клеточный монослой. Затем нагревают до комнатной температуры. Добавляют приблизительно 5 мл культуральной среды и встряхивают колбу, чтобы разрушить стенки клеток. Содержимое каждой колбы переносят в контейнер с культуральной жидкостью. Затем культуральную жидкость, содержащую ЭМКВ, переносят в 50 мл пластиковые центрифужные пробирки и центрифугируют при ускорении 500 *g*

около 10 мин. Очищенную культуральную жидкость распределяют по стеклянным контейнерам с закручивающейся пробкой в количествах 20 мл, 10 мл, 5 мл, 1 мл, 0,5 мл или 0,2 мл, в соответствии с необходимостью. Хранят при −70 С.

При необходимости большие объемы можно размораживать и распределять по меньшим объемам и повторно замораживать.

При постоянном хранении приблизительно при температуре −70 С ЭМКВ сохраняет свой первоначальный титр, но повторяющиеся циклы замораживания-размораживания или хранение при более высоких температурах, например, при −20 С, приводят к прогрессирующей потери титра.

3.3. ПРОЦЕДУРА ИССЛЕДОВАНИЯ

3.3.1. Определение уровня доза-ответ

Приготовление растворов

Стандарт интерферона (например специфический подтип стандарта ВОЗ интерферона) разводят в культуральной среде А, в 10-ти кратных разведениях таким образом, чтобы доза была в диапазоне 1000 – 0,001 МЕ/мл. Процедура исследования выполняется в 96 ячеечном микротитровом планшете. В каждую ячейку добавляют 100 мкл культуральной среды А. Затем в каждую ячейку, за исключением тех, которые предназначены для вирусных контролей, добавляют приблизительно 100 мкл каждого раствора препарата сравнения, используя многоканальные пипетки на 100 мкл. Содержимое ячеек перемешивают.

Распределение клеточной суспензии

Суспензию клеток Hep2c, содержащую приблизительно $6 \cdot 10^5$ клеток/мл клеточной культуры А, разливают в пластиковые чашки Петри.

Используя многоканальную пипетку на 100 мкл, переносят клеточную суспензию из чашек Петри в каждую ячейку многотитровых планшетов. Помещают планшеты приблизительно на 24 ч в инкубатор, установленный на 37°С и содержащий 5% углерода диоксида.

Вирусная инфекция

На этом этапе, используя микроскоп, проверяют, чтобы монослои клеток Hep2c были сплошными, имели правильную морфологию и были живыми.

Удаляют большую часть культуральной среды, перевернув планшет, встряхнув его и промокнув бумажным полотенцем (процедура идентична той, что описывается ниже по удалению жидкости из микротитровых планшетов). Разводят ЭМКВ свежей культуральной средой А до титра приблизительно $3 \cdot 10^7$ БОЕ/мл (*Примечание: в каждом планшете должно быть около 20 мл вирусной суспензии плюс от 5 до 10% сверх объема*).

Разведенную суспензию, полученную из 9 см стерильных чашек Петри, распределяют, используя многоканальные пипетки, установленные на 200 мкл, во все ячейки, включая вирусные контроли, за исключением клеточных контролей. Добавляют приблизительно 200 мкл культуральной среды А без вируса в каждую ячейку с клеточным контролем.

Планшет помещают в термостат, установленный на 37°С и содержащий 5% углерода диоксида на 24 ч.

Окрашивание

Планшеты проверяют через микроскоп на предмет того, что ЭМКВ вызвал цитопатический эффект (ц.п.э.) в вирусных контролях. Временной интервал для

максимального ц.п.э. может варьировать от одного исследования к другому вследствие характерных изменений клеток Hep2c на введение вируса в течение данного периода непрерывного культивирования.

Большую часть культуральной среды удаляют из ячеек в соответствующий дезинфицирующий раствор (например, натрия гипохлорит). В каждую ячейку добавляют *солевой фосфатный буфер pH 7,4 Р*. Сливают *солевой фосфатный буфер pH 7,4 Р* в дезинфицирующий раствор. В каждую ячейку добавляют 150 мкл окрашивающего раствора. Клетки окрашивают в течение 30 мин при комнатной температуре. Сливают окрашивающий раствор в дезинфицирующий раствор. Распределяют приблизительно 150 мкл фиксирующего раствора. Фиксируют в течение 10 мин при комнатной температуре. Сливают фиксирующий раствор в дезинфицирующий раствор и промывают клеточный монослой, погрузив планшеты в пластиковые контейнеры с проточной водой. Удаляют воду и промокают планшеты бумажными полотенцами. Высушивают планшеты при температуре от 20 С до 37°С до тех пор, пока не испарится вся влага.

В каждую ячейку добавляют 150 мкл *0,1 М раствора натрия гидроксида Р*. Элюируют краску аккуратным встряхиванием планшетов или постукиванием ладонью руки. Перед тем, как снимать спектрометрические показания, необходимо убедиться, что краска равномерно распределилась по всем ячейкам. Снимают показания при длине волны от 610 нм до 620 нм, используя считыватель микротитрового планшета, а в качестве слепой пробы - ячейку или ряд ячеек, содержащих около 150 мкл *0,1 М натрия гидроксида Р* и не содержащих клеток. Определяют концентрации интерферон-стандарта, которые вызывают максимальное и минимальное снижение цитопатического эффекта. Это и есть дозовая зависимость, соответствующая рабочему интервалу исследования.

3.3.2. Процедура исследования

Исследование проводят в соответствии с тем, как описано выше, используя в качестве растворов:

- вещество для исследования, разбавленное двумя объемами культуральной среды А для достижения номинальных концентраций, охватывающих рабочий диапазон исследования;
- в качестве растворов сравнения используют соответствующий стандарт интерферона (например, специфический подтип интерферона ВОЗ), разведенный в двух объемах культуральной среды А для достижения номинальных концентраций, охватывающих рабочий диапазон исследования.

3.3.3. Анализ данных

Результаты исследования снижения цитопатического эффекта в основном соответствуют сигмоидальному графику доза-ответ, когда функция представлена графически - концентрация интерферона (логарифм обратной величины разведения интерферона) к поглощению красителя.

Строят график функции концентрации интерферона (логарифм обратной величины разведения) к поглощению красителя для стандартного препарата интерферона и для экспериментальных растворов интерферона. Используя линейный участок графика, рассчитывают концентрацию интерферона в образце путем сравнения реакций для экспериментального и стандартного растворов, используя обычные статистические методы для параллельного анализа.

4. ВАЛИДАЦИЯ ДРУГИХ ПРОЦЕДУР

4.1. ВЫБОР КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР И ВИРУСА

В антивирусных исследованиях интерферона использовался целый ряд других комбинаций клеточных культур и вирусов. Например, EMCV использовался в комбинации с эпителиальной клеточной культурой A549 карциномы легких, вирус Semliki Forest или вирус Sindbis использовались с фибробластами человека, с клеточной культурой амниона человека, вирус WISH или Madin-Darby с почечной клеточной культурой крупного рогатого скота. В каждом случае выбор комбинации клеточная культура/вирус основывается на том, какая из них дает наиболее чувствительный ответ на препарат интерферона, предназначенный для исследования, и дает параллельные реакции при сравнении экспериментального препарата и интерферонового стандарта.

4.2. ВЫБОР РЕАКЦИИ

Процедура окрашивания, описанная выше, оценивает оставшиеся жизнеспособные клетки. Кроме того, применялся целый ряд других реакций, включая окрашивание метиленовым синим или кристаллическим фиолетовым или преобразование тиазолинового синего (МТТ). В каждом случае выбор метода основывался на получении подходящей линейной и чувствительной зависимости между реакцией цвета и количеством жизнеспособных клеток.

4.3. СТАТИСТИЧЕСКОЕ ПОДТВЕРЖДЕНИЕ ДОСТОВЕРНОСТИ

Как и в случае с параллельными биоанализами, данное исследование должно соответствовать обычным статистическим критериям линейности реакции, параллелизма и дисперсии.

4.4. ВАЛИДАЦИЯ ПЛАНИРОВАНИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

Как и в случае с процедурой микротитрового планшета, необходимо уделять внимание планированию исследования. В частности, необходимо предусмотреть и исключить системные ошибки в результате неслучайного порядка пипетирования и других факторов.

РЕАГЕНТЫ И КУЛЬТУРАЛЬНАЯ СРЕДА

Культуральная среда А (10% неонатальная телячья сыворотка)	
RPMI 1640 культурная среда, дополненная при необходимости антибиотиками (пенициллин 10000 МЕ/мл; стрептомицин 10 нг/мл)	- 450мл
L-глютамин, 200 мМ, стерильный	- 5мл
Культуральная среда В (2% эмбриональной коровьей сыворотки)	- 490мл
RPMI 1640 культуральная среда, дополненная при необходимости антибиотиками (пенициллин 10000 МЕ/мл; стрептомицин 10нг/мл)	
L-глютамин, 200 мМ, стерильный	- 5мл
Эмбриональная коровья сыворотка	- 10мл
Окрашивающий раствор	
Нафталин черный	- 0,5 г
Кислота уксусная ледяная	- 90 мл
Натрия ацетат безводный	- 8,2 г
Вода	-1000 мл

Фиксирующий раствор

Формальдегид 40 %	-100 мл
Кислота уксусная ледяная	- 90 мл
Натрия ацетат безводный	- 8,2 г
Вода	- 1000 мл

5.7. ТАБЛИЦА ФИЗИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК РАДИОНУКЛИДОВ, УПОМИНАЕМЫХ В ФАРМАКОПЕИ

Следующая таблица приведена в дополнение к общей статье *Радиофармацевтические препараты* (0125).

Данные взяты из базы данных National Nuclear Data Center (NNDC) Brookhaven National Laboratory, Upton. N.Y., USA, а также размещены в Интернете по адресу: "http://www.nndc.bnl.gov/nndc/nudat/radform.html".

В том случае, когда был использован другой источник информации (более современные знания), это указывается.

Другие источники информации:

*DAMRI (Département des Applications et de la Métrologie des Rayonnements Ionisants, CEA Gif-sur-Yvette, France),

** PTB (Physikalisch-Technische Bundesanstalt, Braunschweig, Germany),

*** NPL (National Physical Laboratory, Teddington, Middlesex, UK).

Отклонение в периоде полураспада дается в круглых скобках, цифра в круглых скобках является стандартным отклонением, соответствующей последней цифре, в соответствии с "Руководством по выражению отклонения в измерениях", Международной организации по стандартизации (ISO), 1993, ISBN 92-67-10188-9).

В тексте используются следующие аббревиатуры:

e_A – возбужденные электроны,
ce – конверсионные электроны,
β^- - электроны,
β^+ - позитроны,
γ – гамма-излучение,
X – рентгеновское излучение.

Радионуклиды	**Период полураспада**	**Эмиссия электронов**			**Эмиссия фотонов**		
		Вид	**Энергия (мЭв)**	**Вероят-ность эмиссии (на 100 распа-дов)**	**Вид**	**Энергия (мЭв)**	**Вероят-ность эмиссии (на 100 распа-дов))**
Тритий (^{3}H)	*12,33 (6) г	*β^-	*0,006 (I) (макс: 0.019)	*100			
Углерод-11 (^{11}C)	20,385 (20) мин	β^+	0,386(I) (макс: 0,960)	99,8	γ	0,511	199,5 (II)
Азот-13 (^{13}N)	9,965 (4) мин	β^+	0,492(I) (макс: 1,198)	99,8	γ	0,511	199,6 (II)
Кислород-15 (^{15}O)	122,24 (16) с	β^+	0,735(I) (макс: 1,732)	99,9	γ	0,511	199,8 (II)
Фтор-18 (^{18}F)	109,77 (5) мин	β^+	0,250(I) (макс: 0,633)	96,7	γ	0,511	193,5 (II)
Фосфор-32 (^{32}P)	14,26 (4) сут	β^-	0,695(I) (макс: 1,71)	100			
Фосфор-33 (^{33}P)	25,34 (12) сут	β^-	0,076(I) (масс: 0,249)	100			
Сера-35 (^{35}S)	87,51 (120) сут	β^-	0,049(I) (макс: 0,167)	100			
Хром-51 (^{51}Cr)	27,7025 (24) сут	e_A	0,004	67	X γ	0,005 0,320	22,3 9,9

(I) Имеется в виду β спектр.
(II) Максимальная вероятность эмиссии, относящейся к суммарной иннигиляции в источнике на 100 распадов.

Радионуклиды	Период полураспада	Эмиссия электронов			Эмиссия фотонов		
		Вид	Энергия (мЭв)	Вероят-ность эмиссии (на 100 распа-дов	Вид	Энергия (мЭв)	Вероят-ность эмиссии (на 100 распа-дов
Кобальт-56 (^{56}Co)	77,27 (3) сут	e_A	0,006	47	X	0,006–0,007	25
		β^+	0,179^(I)	0,9	γ	0,511	38,0 ^(II)
			0,631^(I)	18,1		0,847	100,0
						1,038	14,1
						1,175	2,2
						1,238	66,1
						1,360	4,3
						1,771	15,5
						2,015	3,0
						2,035	7,8
						2,598	17,0
						3,202	3,1
						3,253	7,6
Кобальт-57 (^{57}Co)	271,79 (9) сут	e_A + ce	0,006 – 0,007	177,4	X	0,006-0,0007	57
		ce	0,014	7,4	γ	0,014	9,2
			0,115	1,8		0,122	85,6
			0,129	1,3		0,136	10,7
						0,692	0,15
Кобальт-58 (^{58}Co)	70,86 (7) сут	e_A	0,006	49,4	X	0,006-0,007	26,3
		β^+	0,201^(I)	14,9	γ	0,511	29,9^(II)
						0,811	99,4
						0,864	0,7
						1,675	0,5
Кобальт-60 (^{60}Co)	5,2714 (5) г	β^-	0,096^(I) (макс: 0,318)	99,9	γ	1,173	100,0
						1,333	100,0

(I) Имеется в виду β спектр.

(II) Максимальная вероятность эмиссии, относящейся к суммарной иннигиляции в источнике на 100 распадов.

Радионуклиды	Период полураспада	Эмиссия электронов			Эмиссия фотонов		
		Вид	Энергия (мЭв)	Вероят-ность эмиссии (на 100 распа-дов)	Вид	Энергия (мЭв)	Вероят-ность эмиссии (на 100 распа-дов)
Галлий-66 (^{66}Ga)	9,49 (7) ч	e_A	0,008	21	X	0,009-0,010	19,1
		β^+	0,157[I]	1	γ	0,511	112[II]
			0,331[I]	0,7		0,834	5,9
			0,397[I]	3,8		1,039	37
			0,782[I]	0,3		1,333	1,2
			1,90[I]	50		1,919	2,1
						2,190	5,6
						2,423	1,9
						2,752	23,4
						3,229	1,5
						3,381	1,5
						3,792	1,1
						4,086	1,3
						4,295	4,1
						4,807	1,8
Галлий-67 (67Ga)	3,2612 (6) сут	e_A	0,008	62	X	0,008-0,010	57
		ce	0,082-0,084	30,4	γ	0,091-0,093	42,4
			0,090-0,092	3,6		0,185	21,2
			0,175	0,3		0,209	2,4
						0,300	16,8
						0,394	4,7
						0,888	0,15
Германий-68 (^{68}Ge) в равновесии с Галлий-68 (^{68}Ga)	270,82 (27) сут (^{68}Ga: 67,629 (24) мин)	e_A	0,008	42,4	X	0,009-0,010	44,1
		β^+	0,353[I]	1,2	γ	0,511	178,3
			0,836[I]	88,0		1,077	3,0
Галлий-68 (^{68}Ga)	67,629 (24) мин	e_A	0,008	5,1	X	0,009-0,010	4,7
		β^+	0,353[I]	1,2	γ	0,511	178,3
			0,836[I]	88,0		1,077	3,0
Криптон-81m (^{81}mKr)	13,10 (3) с	ce	0,176	26,4	X	0,012-0,014	17,0
			0,189	4,6			
					γ	0,190	67,6

(I) Имеется в виду β спектр.

(II) Максимальная вероятность эмиссии, относящейся к суммарной инингиляции в источнике на 100 распадов.

Радионуклиды	Период полураспада	Эмиссия электронов			Эмиссия фотонов		
		Вид	Энергия (мЭв)	Вероят-ность эмисси и (на 100 распа-дов)	Вид	Энергия (мЭв)	Вероят ность эмис-сии (на 100 распад ов)
Рубидий-81 (^{81}Rb) в равновесии с Криптон-81m (^{81m}Kr)	4,576 (5) ч (^{81m}Kr: 13,10 (3) с)	e_A ce β$^+$	0,011 0,176 0,188 0,253[I] 0,447[I]	31,3 25,0 4,3 1,8 25,0	X γ	0,013-0,014 0,190 0,446 0,457 0,510 0,511 0,538	57,2 64 23,2 3,0 5,3 54,2 2,2
Стронций-89 (^{89}Sr) в равновесии с Иттрий-89m (^{89m}Y)	50,53 (7) сут (^{89m}Y: 16,06 (4) с)	β$^-$	0,583[I] (макс: 1,492)	99,99	γ	0,909	0,01
Стронций-90 (^{90}Sr) в равновесии с Иттрий-90 (^{90}Y)	28,74 (4) г (^{90}Y: 64,10 (8) ч)	β$^-$	0,196[I] (макс: 0,546)	100			
Иттрий-90 (^{90}Y)	64,10 (8) ч	β$^-$	0,934[I] (макс: 2,280)	100			
Молибден-99 (^{99}Mo) в равновесии с Техниций-99m (^{99m}Tc)	65,94 (1) ч (^{99m}Tc: 6,01 (1) ч)	β$^-$	0,133[I] 0,290[I] 0,443[I]	16,4 1,1 82,4	X γ	0,018-0,021 0,041 0,141 0,181 0,366 0,740 0,778	3,6 1,1 4,5 6 1,2 12,1 4,3
Технеций-99m (^{99m}Tc)	6,01 (1) ч	ce e_A ce	0,002 0,015 0,120 0,137-0,140	74 2,1 9,4 1,3	X γ	0,018-0,021 0,141	7,3 89,1
Технеций-99 (^{99}Tc)	$2,11 \times 10^5$ г	β$^-$	0,085[I] (макс: 0,294)	100			

(I) Имеется в виду β спектр.

(II) Максимальная вероятность эмиссии, относящейся к суммарной иннигиляции в источнике на 100 распадов.

Радионуклиды	Период полураспада	Эмиссия электронов			Эмиссия фотонов		
		Вид	Энергия (мЭв)	Вероятность эмиссии (на 100 распадов)	Вид	Энергия (мЭв)	Вероятность эмиссии (на 100 распадов)
Рутений-103 (^{103}Ru) в равновесии с Родий-103m (^{103m}Rh)	39,26 (2) сут	e_A+ce	0,017	12	X	0,020-0,023	9,0
		ce	0,030-0,039	88,3	γ	0,497	91
						0,610	5,8
	(^{103m}Rh: 56,114	$β^-$	0,031[I]	6,6			
	(20) мин)		0,064[I]	92,2			
Индий-110 (^{110}In)	4,9 (1) ч	e_A	0,019	13,4	X	0,023-0,026	70,5
					γ	0,642	25,9
						0,658	98,3
						0,885	92,9
						0,938	68,4
						0,997	10,5
Индий-110m (^{110m}In)	69,1 (5) мин	e_A	0,019	5,3	X	0,023-0,026	27,8
		$β^+$	1,015[I]	61	γ	0,511	123,4[II]
						0,658	97,8
						2,129	2,1
Индий-111 (^{111}In)	2,8047 (5) сут	e_A	0,019	15,6	X	0,003	6,9
						0,023-0,026	82,3
		ce	0,145	7,8			
			0,167-0,171	1,3	γ	0,171	90,2
			0,219	4,9		0,245	94,0
			0,241-0,245	1,0			
Индий-114m (^{114m}In) в равновесии с Индий-114 (^{114}In)	49,51 (1) сут	ce	0,162	40	X	0,023-0,027	36,3
			0,186-0,190	40			
					γ	0,190	15,6
		*$β^-$	0,777[I] (макс:	95		0,558	3,2
	(^{114}In: 71,9		1,985)			0,725	3,2
	(1) с)						
Теллур-121m (^{121m}Te) в равновесии с Теллур-121 (^{121}Te)	154,0 (7) сут	e_A	0,003	88,0	X	0,026-0,031	50,5
			0,022-0,023	7,4			
					γ	0,212	81,4
		ce	0,050	33,2		1,102	2,5
	(^{121}Te: 19,16		0,077	40,0			
	(5) сут)		0,180	6,1			

(I) Имеется в виду β спектр.
(II) Максимальная вероятность эмиссии, относящейся к суммарной иннигиляции в источнике на 100 распадов.

Радионуклиды	Период полураспада	Эмиссия электронов			Эмиссия фотонов		
		Вид	Энергия (мЭв)	Вероятность эмиссии (на 100 распадов)	Вид	Энергия (мЭв)	Вероятность эмиссии (на 100 распадов)
Теллур-121 (^{121}Te)	**19,16 (5) сут	e_A	0,022	11,6	X	0,026-0,030	75,6
					γ	0,470	1,4
						0,508	17,7
						0,573	80,3
Йод-123 (^{123}I)	13,27 (8) ч	e_A	0,023	12,3	X	0,004	9,3
						0,027-0,031	86,6
		ce	0,127	13,6			
			0,154	1,8	γ	0,159	83,3
			0,158	0,4		0,346	0,1
						0,440	0,4
						0,505	0,3
						0,529	1,4
						0,538	0,4
Йод-125 (^{125}I)	59,402 (14) сут	e_A+ ce	0,004	80	X	0,004	15,5
			0,023-0,035	33		0,027	114
						0,031	26
					γ	0,035	6,7
Йод-126 (^{126}I)	13,11 (5) сут	e_A	0,023	6	X	0,027-0,031	42,2
		ce	0,354	0,5	γ	0,388	34
			0,634	0,1		0,491	2,9
						0,511	2,3[(II)]
		$β^-$	0,109[(I)]	3,6		0,666	33
			0,290[(I)]	32,1		0,754	4,2
			0,459[(I)]	8,0		0,880	0,8
						1,420	0,3
		$β^+$	0,530[(I)]	1			

(I) Имеется в виду β спектр.

(II) Максимальная вероятность эмиссии, относящейся к суммарной иннигиляции в источнике на 100 распадов.

Радионуклиды	Период полураспада	Эмиссия электронов			Эмиссия фотонов		
		Вид	**Энергия (мЭв)**	**Вероятность эмиссии (на 100 распадов)**	**Вид**	**Энергия (мЭв)**	**Вероятность эмиссии (на 100 распадов)**
Йод-131 (^{131}I)	8,02070	ce	0,46	3,5	X	0,029-0,030	3,9
	(11) сут		0,330	1,6			
					γ	0,080	2,6
		β^-	0,069 (I)	2,1		0,284	6,1
			0,097 (I)	7,3		0,365	81,7
			0,192 (I)	89,9		0,637	7,2
						0,723	1,8
Ксенон-131m (^{131m}Xe)	11,84 (7) сут	e_A	0,025	6,8	X	0,004	8,3
						0,030	44,0
		ce	0,129	61		0,034	10,2
			0,159	28,5			
			0,163	8,3	γ	0,164	2,0
Йод-133 (^{133}I) (до радиоактивного Ксенон-133)	20,8 (1) ч	β^-	0,140 (I)	3,8	γ	0,530	87
			0,162 (I)	3,2		0,875	4,5
			0,299 (I)	4,2		1,298	2,4
			0,441 (I)	83			
Ксенон-133 (^{133}Xe)	5,243 (1) сут	e_A	0,026	5,8	X	0,004	6,3
						0,031	40,3
		ce	0,045	55,1		0,035	9,4
			0,075-0,080	9,9			
					γ	0,080	38,3
		β^-	0,101 (I)	99,0			
Ксенон-133m (^{133m}Xe) (до радиоактивного Ксенона-133)	2,19 (1) сут	e_A	0,025	7	X	0,004	7,8
						0,030	45,9
		ce	0,199	64,0		0,034	10,6
			0,228	20,7			
			0,232	4,6	γ	0,233	10,0

(I) Имеется в виду β спектр.

(II) Максимальная вероятность эмиссии, относящейся к суммарной иннигиляции в источнике на 100 распадов.

Радионуклиды	Период полураспада	Эмиссия электронов			Эмиссия фотонов		
		Вид	Энергия (мЭв)	Вероятность эмиссии (на 100 распадов)	Вид	Энергия (мЭв)	Вероятность эмиссии (на 100 распадов)
Йод-135 (^{135}I) (до радиоактивного Ксенона-135)	6,57 (2) ч	β^-	0,140(I)	7,4	γ	*0,527	13,8
			0,237(I)	8		0,547	7,2
			0,307(I)	8,8		0,837	6,7
			0,352(I)	21,9		1,039	8,0
			0,399(I)	8		1,132	22,7
			0,444(I)	7,5		1,260	28,9
			0,529(I)	23,8		1,458	8,7
						1,678	9,6
						1,791	7,8
Ксенон-135 (^{135}Xe)	9,14 (2) ч	ce	0,214	5,5	X	0,031-0,035	5,0
		β^-	0,171	3,1	γ	0,250	90,2
			0,308	96,0		0,608	2,9
Цезий-137 (^{137}Cs) в равновесии с Барием-137m (^{137m}Ba)	30,04 (3) ч	e_A	0,026	0,8	X	0,005	1
						0,032-0,036	7
		ce	0,624	8,0			
			0,656	1,4	γ	0,662	85,1
		β^-	0,174(I)	94,4			
	^{137m}Ba: 2,552 (1) мин		0,416(I)	5,6			
Таллий-200 (^{200}Tl)	26,1 (1) ч	ce	0,285	3,4	X	0,010	32,0
			0,353	1,4		0,069-0,071	63,3
						0,08	17,5
		β^-	0,495(I)	0,3			
					γ	0,368	87,2
						0,579	13,8
						0,828	10,8
						1,206	29,9
						1,226	3,4
						1,274	3,3
						1,363	3,4
						1,515	4,0

(I) Имеется в виду β спектр.

(II) Максимальная вероятность эмиссии, относящейся к суммарной иннигиляции в источнике на 100 распадов.

Радионуклиды	Период полураспада	Эмиссия электронов			Эмиссия фотонов		
		Вид	Энергия (мЭв)	Вероят-ность эмисси и (на 100 распа-дов)	Вид	Энергия (мЭв)	Вероят-ность эмиссии (на 100 распа-дов)
Свинец-201 (^{201}Pb) (до радиоактивного Таллия -201)	9,33 (3) ч	e_A	0,055	3	X	0,070-0,073	69
						0,083	19
		ce	0,246	8,5			
			0,276	2	γ	0,331	79
			0,316	2,3		0,361	9,9
						0,406	2,0
						0,585	3,6
						0,692	4,3
						0,767	3,2
						0,826	2,4
						0,908	5,7
						0,946	7,9
						1,099	1,8
						1,277	1,6
Таллий-201 (^{201}Tl)	72,912 (17) ч	ce	0,016-0,017	17,7	X	0,010	46,0
			0,027-0,029	4,1		0,069-0,071	73,7
			0,052	7,2		0,080	20,4
			0,084	15,4			
			0,153	2,6	γ	0,135	2,6
						0,167	10,0
Таллий-202 (^{202}Tl)	12,23 (2) сут	e_A	0,054	2,8	X	0,010	31,0
						0,069-0,071	61,6
		ce	0,357	2,4		0,080	17,1
					γ	0,440	91,4
Свинец-203 (^{203}Pb)	51,873 (9) ч	e_A	0,055	3,0	X	0,010	37,0
						0,071-0,073	69,6
		ce	0,194	13,3		0,083	19,4
					γ	0,279	80,8
						0,401	3,4

(I) Имеется в виду β спектр.

(II) Максимальная вероятность эмиссии, относящейся к суммарной иннигиляции в источнике на 100 распадов.

5.8. БИОДОСТУПНОСТЬ И БИОЭКВИВАЛЕНТНОСТЬ ГЕНЕРИЧЕСКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

1. ВВЕДЕНИЕ

Генерические лекарственные средства должны удовлетворять тем же стандартам качества, эффективности и безопасности, что и оригинальные лекарственные средства, но при этом дополнительно должно быть предоставлено убедительное подтверждение того, что они эквивалентны, ранее зарегистрированным аналогичным лекарственным средствам и клинически взаимозаменяемы с ними.

Оценка биоэквивалентности генерических лекарственных средств (средств, содержащих одно и тоже лекарственное вещество в одинаковой дозе и в той же лекарственной форме, что и оригинальное лекарственное средство) считается основным видом медико-биологического контроля их эффективности. Оценка биодоступности генерических лекарственных средств выполняется в случаях, если средство содержит одно и то же лекарственное вещество в одинаковой дозе, но при этом имеет отличную лекарственную форму от оригинального лекарственного средства.

Исследования биоэквивалентности и биодоспуности позволяют сделать обоснованный вывод об их эффективности по меньшему объему первичной информации и в более сжатые сроки, чем проведение клинических испытаний.

Несмотря на то, что для некоторых групп лекарственных средств, в первую очередь парентеральных, содержащих компоненты хорошо растворимые в воде, не требуется проведение биоэквивалентных исследований, тем не менее, для большинства номинально эквивалентных лекарственных средств (включая большинство твердых оральных дозированных форм), должна быть проведена демонстрация терапевтической эквивалентности.

Таким образом, положения правил распространяются на генерические лекарственные средства, произведенные разными предприятиями, но которые должны быть биоэквивалентны и клинически взаимозаменяемы и не распространяются на лекарственные средства, включая биологические, такие как вакцины, сыворотки животных, препараты человеческой крови и плазмы, и препараты произведенные при помощи биотехнологии.

Настоящие правила подготовлены на основе следующих нормативных документов:

Основной целью правил является предоставление технического руководства специалистам при проведении экспертизы документации на предмет возможности регистрации и проведения испытаний генерических лекарственных средств и обеспечение гарантий пациентам по защите их здоровья, безопасности и прав.

2. ОСНОВНЫЕ ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Приведенные ниже определения касаются терминов, использованных в настоящих правилах, так как они могут иметь иные значения в других документах и изданиях.

Биологическая доступность (биодоступность, bioavailability)

Скорость и степень доступности действующего вещества или его активного компонента из дозированной лекарственной формы в месте действия, которые определяют с помощью кривой зависимости «концентрация-время» в системном кровообращении или по выделению в моче. При этом считают, что вещество a priori в системном кровотоке находится в динамическом равновесии с веществом в месте действия.

Абсолютную биодоступность данной лекарственной формы определяют путем сравнения с биодоступностью (100%) этого лекарственного средства при условии

его внутрисосудистого введения (например, раствор для орального применения в сравнении с раствором для внутривенного введения).

Относительную биодоступность данной лекарственной формы определяют путем сравнения с биодоступностью другой лекарственной формы, введенной тем же или другим (но не внутривенным) путем (например, таблетки в сравнении с раствором для орального применения).

Основой проведения исследований биоэквивалентности и биодоступности генерических лекарственных средств является определение относительной биодоступности.

Биологическая эквивалентность (биоэквивалентность, bioequivalence)

Два лекарственных средства биологически эквивалентны, если они фармацевтически эквивалентны или они фармацевтически альтернативны и их биологические доступности (скорость и степень доступности), после приема в одной и той же молярной дозе, похожи до такой степени, что можно предполагать, что их терапевтические эффекты и показатели безопасности будут по существу одинаковыми.

Взаимозаменяемое лекарственное средство

Это лекарственное средство, которое терапевтически эквивалентно эталонному лекарственному средству.

Генерическое лекарственное средство (родовой препарат)

Это лекарственное средство, содержащее одно и то же лекарственное вещество в одинаковой дозе и в той же лекарственной форме, что и оригинальное лекарственное средство и которое является биоэквивалентным с оригинальным и производится без лицензии от компании, владеющей оригинальным лекарственным средством и продается после истечения срока патента или других эксклюзивных прав на оригинальный препарат. Они могут продаваться под международными наименованиями или под новыми торговыми наименованиями.

Допускается присутствие на фармацевтическом рынке генерических средств в дозированных формах и\или количестве отличном от оригинальных лекарственных средств.

Лекарственная форма

Это придаваемый лекарственному средству вид, определяющий его состояние, дозировку, упаковку и способ применения.

Оригинальное (исходное, «инновационное») лекарственное средство

Это лекарственное средство, которое отличается от всех ранее зарегистрированных лекарственных средств фармакологически активным действующим веществом или комбинацией таких веществ.

При проведении исследований биоэквивалентности и биодоступности «референтное» средство должно быть, по-возможности, «инновационным» средством.

Терапевтическая эквивалентность (therapeutic equivalence)

Лекарственное средство является терапевтически эквивалентным другому лекарственному средству, если оно фармацевтически эквивалентно ему и после приема в одной и той же молярной дозе его клиническое воздействие с точки зрения и эффективности и безопастности, будет по существу одинаковым средству, эффективность и безопасность которого установлена, о чем свидетельствуют данные соответствующих исследований (биоэквивалентности, фармакодинамические, клинические или иследования in vitro).

С практической точки зрения доказательство биоэквивалентности, как правило, является наиболее подходящим способом доказательства терапевтической эквивалентности лекарственных средств при условии, что эти средства содержат вспомогательные вещества, которые известны как компоненты не влияющие на безопасность и эффективность, а также при соблюдении требований к маркировке относительно вспомогательных веществ.

В некоторых случаях, когда при подобной степени абсорбции наблюдается различная скорость всасывания, лекарственные средства могут быть признаны терапевтически эквивалентными, если такие различия не являются важными в терапевтическом отношении (для подтверждения этого могут потребоваться дополнительные клинические исследования).

Фармацевтическая эквивалентность (pharmaceutical equivalence)

Лекарственные средства являются фармацевтически эквивалентными, если они содержат одинаковое количество одного и того же активного вещества (или веществ) в одной и той же лекарственной форме, соответствуют одним и тем же сопоставимым стандартам и применяются одинаковым способом. Однако, фармацевтическая эквивалентность не обязательно предполагает биологическую или терапевтическую эквивалентность, так как различия в наполнителях и\или в процессе производства могут приводить к различиям в эффективности препарата.

Фармацевтически альтернативные лекарства (pharmaceutical alternatives)

Лекарственные средства являются фармацевтически альтернативными, если они содержат один и тот же активный компонент (или компоненты), но различаются его химической формой (соль, эфир и др.), лекарственной формой или силой действия (активностью).

Эталонное (справочное) лекарственное средство

Это лекарственное средство, с которым предполагается взаимозаменяемость в клинической практике. Эталонное (справочное) лекарственное средство это обычно оригинальное лекарственное средство, для которого уже установлены эффективность, безопастность и качество. Там, где оригинальное лекарственное средство неизвестно, в его роли может выступать препарат, который лидирует на рынке сбыта, зарегистрирован и разрешен к медицинскому применению с установленной и задокументированной эффективностью, безопасностью и качеством.

Дозировка лекарственного средства

Это количество (г, мг, мкг) лекарственного средства в единице лекарственной формы (таблетка, капсула, драже и т.д.).

Доза лекарственного средства

Это количество (г, мг, мкг) лекарственного средства на один прием (однократное или многократное применение).

3. РЕГИСТРАЦИОННАЯ ОЦЕНКА ВЗАИМОЗАМЕНЯЕМЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Процедура регистрации должна гарантировать, что все лекарственные средства, в том числе и генерические, прошедшие регистрацию соответствуют общепринятым стандартам качества, безопастности и эффективности, и что все условия при производстве, хранении и реализации соответствуют стандартам надлежащей производственной практики (GMP).

Номинально эквивалентные взаимозаменяемые (генерические) лекарственные средства должны содержать одинаковое количество одинаковых терапевтически активных ингредиентов и должны соответствовать фармакопейным стандартам. Однако, они обычно не являются идентичными, и при некоторых обстоятельствах их клиническая взаимозаменяемость может вызывать сомнения. Несмотря на то, что различия в цвете, форме и вкусе очевидны, и это приводит в замешательство пациентов, они часто не оказывают никакого существенного влияния на действие лекарственного средства. Однако, различия в потенциальной чувствительности из-за использования различных наполнителей, и различия в стабильности и биологической доступности, могут иметь очевидные клинические последствия. Поэтому необходимо следить не только за качеством, эффективностью и безопасностью таких лекарст-

венных средств, но и за их взаимозаменяемостью. Концепция взаимозаменяемости применима не только к лекарственным формам, но и к инструкциям по их применению и даже к техническим параметрам упаковок, если они имеют решающее значение для стабильности и срока годности.

4. ИССЛЕДОВАНИЯ ЭКВИВАЛЕНТНОСТИ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ РЕГИСТРАЦИИ ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА

4.1. Методы исследований эквивалентности

Для фармацевтически эквивалентных или альтернативных лекарственных средств должна быть доказана терапевтическая эквивалентность к другому средству для установления факта взаимозаменяемости. Некоторые методы таких исследований приведены ниже:

- Сравнительные исследования по оценке биологической доступности (биологической эквивалентности) на людях, при которых измеряется концентрация активного ингредиента лекарственного средства либо одного или более метаболитов в доступной биологической жидкости, например, плазма, кровь или моча.
- Сравнительные фармакодинамические исследования на людях.
- Сравнительные клинические испытания.
- Определение сравнительной кинетики растворения in vitro ("в пробирке") в трех буферных растворах.

Другие методы, которые также могут быть использованы для оценки биологической эквивалентности, например, исследования биологической эквивалентности на животных, допускаются лишь в особо оговоренных случаях.

Выбор процедуры исследования зависит от многих факторов, включая характеристику активного действующего вещества, лекарственного средства и наличие необходимых ресурсов для его проведения. Поэтому выбор производится исследователем исходя из настоящих правил по согласованию со спонсором и утверждается Министерством здравоохранения после проведения независимой экспертизы и рассмотрения Фармакологическим комитетом.

4.2. Необходимость исследования эквивалентности и их типы

Во всех нижеописанных случаях требуется предоставление документации об эквивалентности для генерических лекарственных средств.

При проведении исследований биоэквивалентности препарат должен сравниваться с эталонным лекарственным средством, входящим в Государственный реестр лекарственных средств Республики Беларусь (инновационное лекарственное средство или в случае его отсутствия на рынке – лекарственное средство, которое зарегистрировано на рынке одним из первых, содержит в регистрационном досье сведения относительно клинической эффективности и безопасности и является лидером продаж и происходит из стран с хорошо регулируемым фармацевтическим рынком, таких как Австралия, Канада, США, Швейцария, Япония, страны Евросоюза). Средство сравнения (референтное средство) должно быть в той же лекарственной форме и дозировке, что и испытуемое лекарство. Для выбора референтного средства можно руководствоваться рекомендуемым ВОЗ списком средств-компараторов [11].

Содержание действующего вещества в исследуемом лекарственном средстве и эталонном не должно отличаться более чем на 5%.

Если невозможно выбрать референтное средство аналогичной лекарственной формы и дозировки из имеющихся на рынке, то в качестве средства сравнения допустимо использовать фармацевтически альтернативное средство (иной лекарственной формы и дозировки). В этом случае выполняют исследование сравнительной биодоступности, в рамках которых рассчитывают, по возможности, параметры ожидаемой максимальной и минимальной стационарной концентрации и режимов равноэквивалентного дозирования.

4.2.1. Исследования биоэквивалентности/биодоступности (исследования на человеке)

Сравнительные исследования по оценке биоэквивалентности/биодоступности, осуществляемые на людях, проводятся для следующих групп лекарственных средств и форм:

1) любые лекарственные формы предназначенные для перорального приема, содержащие лекарственные средства с системным действием (таблетки, капсулы, драже, порошки, сиропы, суспензии, эмульсии, микстуры, эликсиры и проч.). В случаях, когда применимы один или несколько следующих критериев предоставление данных относительно биологической эквивалентности или сравнительной биодоступности с эталонным препаратом является обязательным:
   a) назначаются при тяжелых патологических состояниях, требующих гарантированной терапевтической эффективности;
   b) узкий терапевтический спектр действия и узкие границы безопасности (крутая кривая зависимости «доза – реакция»);
   c) фармакокинетика осложнена изменчивой или неполной абсорбцией или окном абсорбции, нелинейная фармакокинетика, пресистемная элиминация и интенсивный метаболизм при первом прохождении более 70%;
   d) неблагоприятные физико-химические свойства, например, низкая растворимость, нестабильность, метастабильные модификации, слабая проницаемость;
   e) имеются документальные доказательства изменчивости биологической доступности самого лекарственного средства и средств сходной химической структуры и состава;
   f) высокое соотношение наполнителей и активных ингредиентов;
2) непероральные и непарентеральные лекарственные средства, предназначенные для воздействия посредством системной абсорбции (например, мази, гели,, биодеградирующие таблетки, суппозитории);
3) медленно высвобождающиеся лекарственные средства и другие формы препаратов с модифицированным высвобождением активного вещества, которые предназначены для воздействия посредством системной абсорбции (включая трансдермальные терапевтические системы);
4) фиксированные комбинации в комплексных средствах системного действия;
5) любые качественные или количественные изменения состава лекарственного средства (в том числе изменение соотношения вспомогательных ингредиентов, соотношения активных и вспомогательных ингредиентов) выполненные после проведения предшествующих исследований эквивалентности или регистрации лекарственного средства.

В связи с тем, что концепция биоэквивалентности не приемлема для доказательства эквивалентности нерастворимых лекарственных средств, предназначенных для местного (несистемного) действия (мази, пластыри, глазные капли и др.), в этом случае проводятся сравнительные клинические или фармакодинамические исследования.

4.2.2. Общие методические подходы к выполнению исследований биоэквивалентности/биодоступности

Исследования биоэквивалентности проводятся с одной дозировкой (желательно наибольшей) данного генерического средства принимаемой натощак, даже если для регистрации он заявлен в нескольких дозировках, только в том случае, если выполняются все следующие условия:

1) средство находится в лекарственной форме немодифицированного (немедленного) высвобождения;
2) все дозировки данного средства произведены в одинаковых промышленных условиях, по идентичной технологии;

3) соотношение между активным фармакологическим ингредиентом и наполнителями во всех дозировках постоянно (в случае, если количество активного фармакологического ингредиента составляет менее 5% лекарственной формы – соотношение между ингредиентами наполнителей во всех дозировках постоянно);
4) в диапазоне заявленных на регистрацию дозировок зависимость «доза-эффект» для данного лекарственного средства носит линейный характер;
5) профили исследования кинетики растворения для всех заявленных на регистрацию дозировок лекарственного средства в трех буферных растворах эквивалентны.

Назначение исследуемого (тестируемого) препарата и препарата сравнения осуществляется в дозах, не превышающих высшие терапевтические, но достаточных для создания оптимальных условий аналитического определения их (или метаболитов) концентраций в биологических жидкостях организма с учетом чувствительности метода и возможностей аппаратуры.

В случае если на регистрацию заявляется лекарственное средство в кишечнорастворимой оболочке, средство, которое следует принимать после еды, либо пища влияет на биодоступность лекарственного средства следует проводить исследование с двухкратным приемом лекарства – натощак и через 30 минут после приема горячей, высококалорийной и богатой жирами пищи.

В случае лекарственных форм пролонгированного типа действия биоэквивалентность следует проверять для каждой дозы в отдельности в условиях однократного и многократного приема (достижения стационарного состояния) если кинетика лекарственного средства нелинейна. В случае если кинетика лекарственного средства линейна, проводят испытания эквивалентности в условиях однократного приема всех дозировок, а с наибольшей дозировкой дополнительно выполняют исследования в условиях многократного приема (достижения стационарного состояния).

Для трансдермальных лекарственных форм проводят испытания с формой имеющей максимальную дозировку в условиях однократной и многократной аппликации на идентичные области тела.

Для оральных лекарственных средств с длительным периодом полуэлиминации может быть проведено исследование как с использованием перекрестного дизайна, так и исследование биологической эквивалентности/биодоступностив параллельных группах добровольцев. В обоих случаях время отбора образцов должно перекрывать время прохождения лекарственного средства по ЖКТ и его абсорбции (не менее 2-3 дней). Любое сокращение данного периода отбора проб должно быть документально обосновано. При использовании параллельного дизайна число включаемых в исследование добровольцев должно быть не менее чем в 2 раза большим, чем для дизайна с перекрестными группами.

В случаях изучения биоэквивалентности/биодоступности сильнодействующих или токсичных средств допускается проведение исследования на пациентах с использованием многократного повторного дозирования без прерывания терапии как это описано в п. 5.2.

4.2.3. Исследования сравнительной кинетики растворения (исследования вне живого организма)

Исследования теста сравнительной кинетики растворения выполняется для всех заявляемых на регистрацию дозировок средств в твердых лекарственных формах как этап предшествующий проведению исследований биологической эквивалентности или биодоступности.

Исследование выполняется в трех буферных растворах объемом 250 мл в интервале pH 1-8, при температуре 37°C (предпочтительно при pH около 1,0; 4,6 и 6,8).

Для некоторых лекарственных средств и форм эквивалентность может быть установлена после проведения такого теста сравнительной кинетики растворения в трех буферных растворах in vitro ("в пробирке") без выполнения исследований био-эквивалентности или биодоступности на людях. Это допустимо только в следующих случаях:

1) для лекарственных средств, доказательства эквивалентности которых не требуют исследований на живом организме (см. ниже);
2) для лекарственных средств которые относятся к I классу по биофармацевтической классификации лекарственных средств (средства-биовейверы) [5, 9, 16, 21, 24].
3) для генерических лекарственных средств различающихся только содержанием активного компонента и производимых одним и тем же изготовителем на одном предприятии и при этом:
   a) соответствующее исследование по оценке биоэквивалентности было выполнено по крайней мере для одной дозировки средства (обычно наивысшей активности, если только по соображениям безопасности не был выбран препарат более низкой активности);
   b) качественный состав лекарственных средств с различной активностью (дозировкой) в основном одинаков;
   c) соотношение активных ингредиентов и наполнителей для лекарственных средств различной активности одинаково, или – в случае препаратов с низкой активностью (доля активного компонента менее 5% от массы лекарственной формы) – соотношение между наполнителями одинаковое;
   d) в случае системной доступности установлено, что фармакокинетика линейна в диапазоне заявляемых на регистрацию дозировок;
4) для подтверждения, что качество лекарственного средства и показатели его эффективности остались прежними после внесения несущественных изменений в состав препарата или в метод его изготовления после проведения регистрации. Несущественность изменений (т.е. отсутствие их влияния на показатели фармакокинетики лекарственного средства) обосновывается документально с предоставлением полнотекстовых публикаций или отчетов.

В случаях, когда информация относительно влияния вспомогательных веществ на фармакокинетические параметры не может быть предоставлена заявителем и УП «Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении» не имеет доступа к этим данным заявитель должен провести соответствующие исследования, с тем, чтобы продемонстрировать, что различия во вспомогательных веществах не влияют на фармакокинетические параметры препарата.

4.3. Отсутствие необходимости в исследованиях биоэквивалентности или биодоступности

Следующие группы лекарственных средств считаются эквивалентными и для них не требуется предоставление специального документального подтверждения эквивалентности у человека:

1) Лекарственные средства вводимые парентерально (например, внутривенно, внутримышечно, подкожно или внутритрахеально) в виде водных растворов, которые содержат то же активное вещество (вещества), что и инновационные эталонные средства в одинаковой с ними концентрации (концентрациях) и те же самые наполнители в сопоставимых концентрациях.
2) Растворы для перорального применения, которые содержат активное вещество в той же концентрации, что и эталонное средство и не содержат наполнителей, которые заведомо или предположительно воздействуют на желудочно-кишечный тракт или абсорбцию активного вещества. Положения указанного пункта не касаются сиропов, микстур, эликсиров, суспензий, эмульсий и прочих жидких лекарственных форм.

3) Газы.

4) Порошки для приготовления растворов, если раствор соответствует вышеприведенным критериям 1) или 2).

5) Ушные или глазные лекарственные средства, приготовленные в виде водных растворов, которые содержат одно и то же активное вещество (вещества) в одинаковой концентрации (концентрациях) и по существу те же самые наполнители в сопоставимых концентрациях.

6) Лекарственные средства для местного применения, приготовленные в виде водных растворов, которые содержат одно и то же активное вещество (вещества) в одинаковой концентрации (концентрациях) и по существу те же наполнители в сопоставимых концентрациях.

7) Ингаляционные лекарственные средства или назальные спреи, которые применяются с помощью практически одинаковых приспособлений (или без них) и приготовлены в виде водного раствора, и содержат одно и то же активное вещество (вещества) в одной и той же концентрации (концентрациях) и содержат в основном одни и те же наполнители в сопоставимых концентрациях. По решению Фармакологического и Фармакопейного комитетов может быть назначено специальное тестирование in vitro ("в пробирке") в отношении устройства для применения ингаляционных лекарственных средств.

В отношении требований пунктов 1), 5), 6) и 7) на заявителя возлагается обязанность документально показать, что состав наполнителей в лекарственных средствах качественно и количественно идентичен эталонным лекарственным средствам.

5. ДИЗАЙН И ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ЭКВИВАЛЕНТНОСТИ И БИОДОСТУПНОСТИ НА ЛЮДЯХ

5.1. Общие требования.

В последующих пунктах сформулированы требования к дизайну и проведению исследований биодоступности и биоэквивалентности. Предполагается, что заявитель знаком с фармакокинетическими теориями, лежащими в основе исследований биодоступности. Дизайн исследования должен быть основан на достаточном знании фармакодинамики и/или фармакокинетики действующего вещества.

Исследование биоэквивалентности по существу представляет собой сравнительное изучение биодоступности, предназначенное для установления эквивалентности между испытуемым препаратом и референтным препаратом. Последующие пункты посвящены в основном исследованиям биоэквивалентности. Поскольку исследования биодоступности являются по характеру сравнительными, содержание последующих пунктов также применимо к этим исследованиям с необходимыми поправками в соответствии с задачей каждого конкретного исследования.

Методология исследований биоэквивалентности может быть использована для оценки различий фармакокинетических параметров при фармакокинетических исследованиях, таких как изучение взаимодействий «лекарство-лекарство» или «лекарство-пища», или для оценки различий в подгруппах популяции. В этом случае необходимо следовать руководящим указаниям, имеющим отношение к делу, и соответствующим образом регулировать выбор субъектов исследования, дизайн исследования и статистический анализ.

Исследования биологической эквивалентности, исследования фармакодинамики и клинические испытания должны быть проведены в строгом соответствии с положениями правил надлежащей клинической практики (GCP).

Исследования по оценке биологической эквивалентности проводятся для сравнения результатов действия испытуемого генерического лекарственного средства «на живом организме» с действием эталонного лекарственного средства.

Оценка эквивалентности может основываться на данных, полученных при однократном введении препаратов, так и при их многократном (курсовом) применении. В последнем случае необходимо, чтобы испытуемые получали препараты в одинаковой разовой дозе с одинаковым интервалом дозирования (в соответствии с инструкцией по медицинскому применению данного лекарственного средства) вплоть до достижения стационарного состояния их концентраций в исследуемых биологических жидкостях.

Исследование биологической эквивалентности включает в себя назначение тестируемого и эталонного препаратов в два приема на добровольцах. Назначение второго лекарства проводится отдельно от первого после «отмывочного» периода такой продолжительности, чтобы лекарственное средство, принятое в первый раз, было полностью выведено из организма до второго приема. Этот период должен составлять не менее $6T_{½}$.

Введение исследуемого (тестируемого) лекарственного средства должно быть стандартизовано, т.е. время суток для приема и объем жидкости (обычно 150 мл) должны быть установлены и строго соблюдаться. Тестируемые лекарственные средства обычно принимаются натощак, стандартный завтрак может быть получен не ранее чем через четыре часа после начала исследования. По крайней мере в течение двух суток до приема изучаемых препаратов и в период проведения исследования испытуемые не должны получать другие лекарственные средства, причем в течение одних суток перед исследованием, равно как и на всем его протяжении необходима диета, исключающая жирную и жареную пищу, напитки, содержащие кофеин и определенные виды фруктовых соков (например, грейпфрутовый сок). При этом к водному и пищевому режиму, предъявляются требования, указанные в программе (протоколе) исследования. Меню составляется заранее и передается в пищеблок для организации питания в строгом соответствии с режимом.

Непосредственно перед введением лекарственного средства и через установленные промежутки времени отбираются образцы крови и\или мочи для определения концентрации лекарственного средства и\или одного или более метаболитов. Увеличение или уменьшение этих концентраций с течением времени в организме каждого испытуемого позволяет установить, как высвобождается лекарственное вещество из тестируемого и эталонного препаратов и как оно абсорбируется организмом. Это позволяет провести сравнение двух лекарственных средств по кривым зависимости «концентрация-время» в крови (включая плазму или сыворотку) и\или в моче и применяется для расчета метрических показателей биологической эквивалентности.

5.2. Испытуемые

Оценка биоэквивалентности всех лекарственных средств, за исключением психотропных, онкохимиотерапевтических и средств, применяемых при ВИЧ-инфекции, проводится на здоровых добровольцах. Соответствующие исследования психотропных средств, а также средств, применяемых при онкологических заболеваниях и ВИЧ-инфекции, могут выполняться на психических и онкологических больных в период ремиссии заболевания и ВИЧ-инфицированных. В этом случае следует обеспечить выполнение 2 следующих условий:

1) поддержание постоянства курса основной терапии в группе добровольцев;
2) отсутствие взаимодействия лекарственных средств, входящих в основной курс с испытуемыми средствами.

Если известно, что активное вещество имеет неблагоприятные побочные реакции, а фармакологические эффекты или риск является неприемлемыми для здоровых добровольцев, то допустимо использовать крупных лабораторных животных (согласно приложению 2). Эта альтернатива должна быть обсуждена со спонсором,

внесена в программу (протокол) исследования и утверждена Министерством здравоохранения.

Популяция субъектов для исследования биологической эквивалентности должна быть как можно более однородна; чтобы снизить вариабельность не обусловленную лекарственным средством. Должны быть установлены ясные критерии включения и исключения испытуемых. По возможности испытуемые должны быть разнополые, однако риск для женщин следует рассматривать на индивидуальной основе и, если это необходимо, они должны быть предупреждены о любой опасности для плода, в случае, если они беременны.

Если в исследование включены умеренно курящие субъекты (менее 10 сигарет в день), их следует соответствующим образом идентифицировать как таковых; необходимо обсудить возможные последствия для результатов исследования.

5.2.1. Критерии включения добровольцев в исследование.

В качестве здоровых добровольцев могут привлекаться лица обоего пола в возрасте от 18 до 45 лет, отвечающие следующим критериям:

- Верифицированный диагноз: «здоров» по данным клинических, лабораторных и инструментальных методов обследования;
- Масса тела не выходит за пределы ±15% по весо-ростовому индексу Кетле;
- Для женщин – отрицательный тест на беременность и согласие придерживаться адекватных методов контрацепции; в случае использования гормональных контрацептивов они должны быть отменены не менее чем за 2 месяца до начала исследования.

5.2.2. Критерии исключения добровольцев из исследования.

- Отягощенный аллергологический анамнез;
- Лекарственная непереносимость;
- Хронические заболевания сердечно-сосудистой, бронхолегочной, нейроэндокринной системы, а также заболевания желудочно-кишечного тракта, печени, почек, системы крови;
- Хирургические вмешательства на желудочно-кишечном тракте (за исключением аппендэктомии);
- Острые инфекционные заболевания менее чем за 4 недели до начала исследования;
- Регулярный прием лекарственных препаратов менее чем за 2 недели до начала исследования;
- Прием лекарственных препаратов, оказывающих выраженное влияние на гемодинамику, функцию печени и др. (барбитураты, омепразол, циметидин, эритромицин, рифампицин и т.д.) менее чем за 30 дней до начала исследования;
- Донорство (450 мл крови или плазмы и более) менее чем за 2 месяца до начала исследования;
- Прием более чем 10 ед. алкоголя в неделю (1 ед. алкоголя эквивалентна 0,5 л пива, 200 мл вина или 50 мл спирта), а также анамнестические сведения об алкоголизме, наркомании, злоупотреблении лекарственными средствами.
- Выкуривание более 10 сигарет в день;
- Участие в I фазе клинических исследований лекарственных средств менее чем за 3 месяца до начала исследования.

5.2.3. Стандартизация исследования

Исследование должно быть спланировано так, чтобы условия испытаний способствовали снижению внутри- и межсубъектной вариабильности и позволили избежать искажения результатов. Стандартизация физических нагрузок, питания, потребления жидкостей и положения тел, ограничение в употреблении алкоголя, кофеина, некоторых фруктовых соков и лекарственных средств, не нужных для иссле-

дования, в период до и в течение исследования является важным для сведения к минимуму вариабильности всех факторов, исключая факторы, связанные с тестируемым лекарственным средством.

Если цель исследования биологической эквивалентности ставит особые вопросы (например, биологическая эквивалентность у специфических групп населения), то критерии отбора должны быть соответствующим образом скорректированы.

Следует принять во внимание фенотипирование и/или генотипирование субъектов для поисковых исследований биодоступности и всех исследований, дизайн которых предполагает параллельные группы. Это можно учитывать также при перекрестных исследованиях (например, биоэквивалентность, пропорциональность дозирования, изучение взаимодействия с пищей и др.) по соображениям безопасности или фармакокинетики. Если известно, что для лекарственного вещества характерна значительная зависимость от генетического полиморфизма, исследования могут быть проведены в группах субъектов с известным фенотипом или генотипом.

5.3. Этические аспекты исследований

Участие здоровых испытуемых и больных в исследованиях биоэквивалентности лекарственных препаратов является добровольным. Доброволец (волонтер) имеет право отказаться от участия в проводимых исследованиях на любой его стадии. Этические нормы проведения испытаний биоэквивалентности регламентированы соответствующими документами. Этическую экспертизу клинических исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов проводит Комитет по этике клинической базы исследований. Добровольцы, включенные в исследование биоэквивалентности, подписывают письменное информированное согласие, один экземпляр которого выдается добровольцу наряду с «Информацией для добровольцев, участвующих в исследовании биоэквивалентности лекарственного препарата» (Приложение 3).

5.4. Группа исследователей-клиницистов

Для проведения исследований биоэквивалентности выделяются сотрудники, контролирующие состояние здоровья добровольцев, соблюдение режима, организацию питания, установку катетеров, отбор образцов крови и их обработку, оказывающие при необходимости экстренную медицинскую помощь. В состав группы обязательно должны входить врач-исследователь (1-2) и медицинская сестра (1-2).

5.5. Формирование банка добровольцев

Банк добровольцев формируется в соответствии с критериями включения в исследования и исключения из исследования, указанными в разделах 5.2.1. и 5.2.2.

В беседе с врачом-исследователем доброволец должен получить следующую информацию:

- цель исследования;
- наличие разрешения на проведение исследования;
- длительность исследования;
- условия отбора проб крови;
- условия, в которых будет находиться доброволец во время исследования, пищевого и водного режима;
- ограничения в приёме лекарств во время исследования;
- возможность оказания медицинской помощи во время и после исследования;
- условия страхования и вознаграждения.

Если доброволец включается а банк данных, на него заводится индивидуальная карта, где указываются:

- ФИО, возраст, адрес, телефон, паспортные данные;
- медицинский анамнез (с указанием хронических заболеваний и аллергологический анамнез);
- перенесенные заболевания, по поводу которых доброволец находился на ста-

ционарном лечении.

В индивидуальной карте регистрируется участие добровольца во всех клинических исследованиях лекарственных средств.

5.6. Формирование группы добровольцев для проведения исследований конкретного лекарственного средства

За 1 неделю до начала испытаний добровольцы, привлекаемые к исследованиям конкретного лекарственного препарата, приглашаются в исследовательский центр. Врач-исследователь проводит с ними беседу, в ходе которой повторно собирается медицинский анамнез и проводится оценка соответствия добровольцев критериям включения в исследование (в соответствии с пп. 5.2.1. и 5.2.2.).

Затем добровольцу предоставляется информация о:

- фармакологической группе, к которой относится исследуемое лекарственное средство;
- механизме его действия;
- показаниях к применению лекарственного средства;
- возможных нежелательных эффектах;
- пути введения и дозе;
- режиме питания перед началом исследования;
- режиме дня во время проведения исследования;
- времени прибытия в исследовательский центр;
- длительности исследования;
- размере вознаграждения за участие в исследовании;
- условиях страхования, компенсации и лечения в случае причинения ущерба здоровью в связи с проведением исследования.

Добровольцу гарантируют, что при необходимости ему будет оказана квалифицированная медицинская помощь как во время, так и после проведения исследования биоэквивалентности, а так же о том, что информация о нем, полученная в ходе исследований, будет иметь конфиденциальный характер. После этого доброволец для участия в исследовании должен подписать «Информированное согласие добровольца», копия которого выдается добровольцу наряду с «Информацией для добровольцев, участвующих в исследования биоэквивалентности лекарственного препарата».

5.7. Скрининговое обследование добровольцев до начала исследований

После подписания информированного согласия перед исследованием проводятся специальные медицинские обследования добровольцев в зависимости от фармакологических особенностей исследуемого лекарственного средства. Проводятся следующие лабораторные тесты:

- клинический анализ крови (эритроциты, гемоглобин, гематокрит, лейкоциты, лейкоцитарная формула, тромбоциты);
- биохимический анализ крови (общий белок, креатинин, мочевина, билирубин, АЛТ, АСТ, γ-ГГТ, щелочная фосфатаза, глюкоза, калий, натрий, хлор);
- клинический анализ мочи (белок, глюкоза, лейкоциты, эритроциты);
- анализ крови на ВИЧ, сифилис, вирусные гепатиты В, С;
- электрокардиографическое исследование;
- для женщин тест на беременность.

При оценке лабораторных анализов возможны следующие варианты решений:

- если все анализы в пределах нормы, доброволец включается в исследование;
- если результаты анализов выходят за пределы, нормы доброволец исключается из испытания или анализы повторяют;
- если результаты повторного анализа положительные, доброволец включается в исследование;

- если результаты повторного исследования выходят за пределы нормы, но отклонение от нормы не имеет клинического значения, доброволец может быть включен в испытание;
- если результаты повторного анализа выходят за пределы нормы и отклонение имеет клиническое значение доброволец исключается из испытания.

Не более чем за 7 дней до начала исследования доброволец осматривается терапевтом, который проводит:

- оценку лабораторных данных и данных электрокардиографического обследования;
- сбор анамнеза (медицинского, аллергологического);
- измерение артериального давления, частоты пульса;
- физикальный осмотр по системам.

Результаты осмотра вносятся в индивидуальные регистрационные карты добровольцев. По результатам клинического осмотра и лабораторного тестирования врач-исследователь делает заключение, на основании которого добровольцы либо допускаются либо не допускаются к исследованию. Врач-исследователь составляет список добровольцев и передает его лицу, ответственному за проведение исследований. После включения добровольцев в исследование производится их рандомизация с использованием методики одномоментной простой рандомизации, результаты который регистрируется в его карте.

5.8. Подготовка клинического блока

Клинический блок, где будут находиться добровольцы, должен включать следующие помещения: палаты для проживания добровольцев, процедурная, столовая, комната отдыха, душевая и туалет. Перед госпитализацией в указанных помещениях должна быть проведена санитарная обработка. Обязательным требованием к проведению исследований биоэквивалентности является наличие блока интенсивной терапии или реанимационного отделения.

5.9. Организация питания добровольцев

Добровольцы в ходе исследования должны получать доброкачественное и сбалансированное питание. Как правило, в меню включаются диетические блюда, исключается жирная и жареная пища и напитки, содержащие кофеин. Меню составляется накануне исследования и подается в пищеблок. Указывается время, к которому должна быть готова пища, название блюд и количество порций.

5.10. Отбор проб крови

При отборе проб крови должны соблюдаться следующие условия:

- кровь отбирается из локтевой вены через кубитальный катетер;
- первая порция крови (исходная, т.е. до приема препарата) берется утром, натощак, через 5-10 минут после установки катетера;
- испытуемый принимает исследуемый препарат или препарат сравнения, запивая его 150-200 мл кипяченой воды;
- время отбора последующих проб соответствует программе исследования;
- пробирки для отбора проб должны иметь маркировку с указанием шифра испытуемого, номера пробы и названия препарата;
- образцы биологической жидкости должны храниться при температуре не выше -20°C;
- первый прием пищи должен быть не ранее, чем через 4 ч после приема лекарственного средства;
- при возникновении экстремальной ситуация (ухудшение самочувствия, психические нарушения, желание испытуемого выйти из исследования) отбор проб прекращается;
- при возникновении непредвиденных ситуаций, исключающих возможность отбора крови в установленном временном интервале, работа с данным испытуемым продолжается, но шифрованная пробирка остается пустой;

- пробы крови с сопроводительным направлением, в котором указываются ФИО испытуемого, пол, возраст, масса тела, рост, соответствующие шифру на пробирке, предоставляются в фармакокинетическую лабораторию,

5.11. Динамическое наблюдение за добровольцами

Динамическое наблюдение за добровольцами в период отбора образцов крови осуществляется врачом-исследователем и включает:

- клинический осмотр каждые 3-8 ч (в зависимости от фармакологических особенностей препарата);
- измерение уровня артериального давления и частоты сердечных сокращений.

Результаты обследования заносятся в индивидуальные карты добровольцев.

По окончании первого периода исследования после удаления катетеров проводится заключительный врачебный осмотр добровольцев. При отсутствии отклонений в состоянии здоровья добровольцев их отпускают домой до начала второго периода исследования.

Перед вторым периодом исследования проводится повторное обследование добровольцев, включающее врачебный осмотр, и, при необходимости, клинико-инструментальные исследования (ЭКГ и другие) лабораторные тесты:

- клинический анализ крови;
- клинический анализ мочи;
- биохимический анализ крови;
- для женщин тест на беременность;
- и другие.

На основания результатов повторного обследования врач-исследователь допускает или не допускает добровольцев ко второму периоду исследования.

Наблюдение за добровольцами в течение второго периода отбора образцов крови осуществляется так же, как и в первом периоде.

После завершения второго периода исследования биоэквивалентности проводится заключительный врачебный осмотр. При отсутствии отклонений в состоянии здоровья добровольцев, их отпускают домой.

Для обеспечения безопасности исследования биоэквивалентности врачом-исследователем проводится мониторинг нежелательных явлений. Случаи возникновения нежелательных явлений регистрируются в индивидуальной карте добровольца и соответствующей форме.

5.12. Дублеры добровольцев

В ходе подготовки к исследованию осуществляется также подбор дублеров на случай замены выбывших из исследования добровольцев, Дублеры до начала исследования должны подписать информированное согласие и пройти обследование в том же объеме, что и добровольцы. Число дублеров составляет 4-6 человек.

Доброволец не может одновременно быть участником двух исследований биоэквивалентности.

После завершения исследования включение добровольца в следующее исследование возможно через 3 месяца или не менее чем через $6T_{½}$ препарата в исследованиях которого участвовал доброволец.

5.13. Исследуемые лекарственные средства

Лекарственные средства (образцы), используемые в исследовании биологической эквивалентности для регистрационных целей, должны быть идентичны проектируемому коммерческому лекарственному средству. По этой причине, не только состав и качественные характеристики (включая стабильность), а также и методы производства должны быть идентичны тем, которые будут применяться при их дальнейшем серийном производстве.

Образцы должны быть взяты из промышленных партий. Когда это невозможно, допускается использовать партии из опытного или мелкосерийного производст-

ва, при условии, что они будут составлять не менее 1\10 (10%) объема максимальной ожидаемой партии серийного производства, но не менее 100.000 единиц.

Содержание активного лекарственного вещества (веществ) в двух исследуемых препаратах не должно отличаться более чем на 5%. Если содержание активного компонента испытуемого средства отклоняется более чем на 5% от эталонного средства с заявленным содержанием 100%, то это различие может быть в дальнейшем использовано для нормализации с помощью дозировок некоторых показателей биодоступности, чтобы облегчить сопоставление исследуемого и эталонного лекарственных средств.

В случае если проводится оценка биоэквивалентности/биодоступности для средств с фиксированной комбинацией компонентов генерическое комбинированное средство должно сравниваться с фармацевтически эквивалентным инновационным комбинированным средством. Только в случае его отсутствия на фармацевтическом рынке могут быть использованы в качестве средств сравнения монопрепараты, назначаемые одновременно в комбинации. Биоаналитические методы в этом случае должны быть подвергнуты валидации в отношении определения всех измеряемых соединений.

5.14. Выбор эталонного лекарственного средства

Инновационное лекарственное средство обычно является наиболее приемлемым эталонным препаратом для близких генерических препаратов, поскольку в целом его качество хорошо проверено, а его эффективность и безопасность надежно подтверждены в клинических испытаниях и в программах пострегистрационного надзора. В том случае, если такой препарат установить нельзя, обычно выбирают лекарственное средство, которое зарегистрировано на рынке одним из первых, содержит в регистрационном досье сведения относительно клинической эффективности и безопасности и является лидером продаж и происходит из стран с хорошо регулируемым фармацевтическим рынком, таких как Австралия, Канада, США, Швейцария, Япония, страны Евросоюза.

Для выбора референтного средства можно руководствоваться рекомендуемым ВОЗ списком средств-компараторов [13].

Объективность выбора оценивается экспертами и утверждается Министерством здравоохранения. Если информация об эталонном лекарственном средстве не может быть представлена заявителем, а УП «Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении» также не располагает этими данными, должны быть проведены клинические испытания.

Генерические лекарственные средства не должны использоваться в качестве референтных препаратов до тех пор пока существует инновационное лекарственное средство, поскольку это может приводить к прогрессивно снижающейся эквивалентности последующих генерических средств и недостаточной их равноценности инновационному средству.

5.15. Запасные образцы

Достаточное количество (необходимое для проведения полного анализа) образцов каждой серии лекарственных средств, используемых для исследования, вместе с результатами их анализов и характеристик, должны храниться у спонсора для справочных и арбитражных целей с соблюдением соответствующих условий хранения не менее одного года после окончания испытаний. По специальному требованию компетентных органов, эти запасные образцы могут выдаваться им для повторной проверки этих лекарственных средств.

6. РЕГЛАМЕНТ ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

6.1. Общая схема исследований

Исследования лекарственных средств осуществляется по слепой рандомизированной перекрестной сбалансированной схеме, включающей два периода и две последовательности – каждый испытуемый последовательно получает исследуемый препарат (T) и препарат сравнения (R) или наоборот (схема «RT/TR»).

Однако, схема исследования зависит от типа лекарственного средства и в ряде случаев более пригодными могут быть иные схемы. Такое изменение определяется исследователем по согласованию со спонсором, вносится в программу (протокол) исследования и утверждается Министерством здравоохранения.

6.2. Число испытуемых

В исследование должно быть включены испытуемые, в количестве достаточном для обеспечения статистической значимости исследования. При этом мощность статистического теста дня проверки биоэквивалентности должна поддерживаться на уровне не меньше 80% для выявления 20%-ных различий между показателями сравнения.

Минимальное число включенных испытуемых 18 человек. Большее число испытуемых может потребоваться для сравнения препаратов, обладающих значительной вариабельностью фармакокинетических параметров.

При планировании эксперимента априорные значения вариации основных показателей сравнения (AUC и C_{max}), необходимые для расчета числа испытуемых, могут быть оценены по результатам сходных исследований, литературным данным, результатам пилотного исследования, а предварительная оценка необходимого числа испытуемых может быть получена с помощью таблицы 1 или номограммы приложения 4.

Если при проведении статистического сравнения уровень мощности теста оказался ниже 80%, в тех случаях, когда сравниваемые препараты оказались небноэквивалентными, для принятия обоснованного заключения о небиоэквивалентности необходимо включить в исследование большее число испытуемых.

Таблица 1. Число испытуемых, необходимых для обеспечения 80% мощности статистического критерия в случае лог-нормального распределения (границы доверительного интервала 0,80-1,25; уровень значимости -5%)

CV* (%)	μ_T/μ_R							
	0,85	0,90	0,95	1,00	1,05	1,10	1,15	1,20
5,0	12	6	4	4	4	6	8	22
7,5	22	8	6	6	6	8	12	44
10,0	36	12	8	6	8	10	20	>48
12,5	>48	16	10	8	10	14	30	>48
15,0	>48	22	12	10	12	20	42	>48
17,5	>48	30	16	14	16	26	>48	>48
20,0	>48	38	20	16	18	32	>48	>48
22,5	>48	46	24	20	24	40	>48	>48
25,0	>48	>48	28	24	28	48	>48	>48
27,5	>48	>48	34	28	34	>48	>48	>48
30,0	>48	>48	40	32	38	>48	>48	>48

** Примечание: CV – коэффициент вариации,* $CV = \sqrt{e^{(s^2)} - 1}$*, где*

s^2 *– средний квадрат «ошибки» или остаточная внутрииндивидуальная вариация, определяемая при дисперсионном анализе после логарифмической трансформации значений показателя;*

m_T *– генеральное среднее показателя сравнения для исследуемого средства;*

m_R *– генеральное среднее показателя сравнения для референтного средства*

6.3. Интервал времени между приемом лекарственных средств

Интервал времени между приемом препаратов зависит от длительности циркуляции лекарственного средства в организме, определяемой периодом полуэлиминации ($T_{½}$), и должен составлять не менее $6T_{½}$.

Достаточность отмывочного периода может быть определена исходя из определения остаточных концентраций лекарства в нулевой точке перед началом второго этапа исследования, которые должны составлять не более чем 5% от величины C_{max} первого этапа исследования.

6.4. Схема отбора проб

Схема отбора проб определяется формой кривой «концентрация действующего вещества – время». Выбор моментов временя отбора проб должен обеспечивать получение нескольких точек для каждого фрагмента фармакокинетической кривой – не менее 2 для фазы первоначального возрастания концентрации, 2 точки вблизи планируемого времени достижения C_{max} и не менее 3-4 точек для фазы элиминации.

Общая продолжительность наблюдения за концентрацией действующего вещества при однократном приеме лекарственного средства должна быть не менее чем в 4 раза больше периода полувыведения, а при многократном приеме препарата – равной интервалу дозирования. При однократном приеме длительность наблюдения считается удовлетворительной, если для усредненного фармакокинетического профиля величина площади под кривой «концентрация - время» в пределах от нуля до момента отбора последней пробы составляет не менее 80% от полной площади.

6.5. Исследование метаболитов

Использование данных о продуктах обмена в исследовании биологической эквивалентности требует осторожного подхода. Оценка биологической эквивалентности основывается в основном на измерении концентраций фармакологически активного вещества и его активных метаболитов, если таковые имеются.

Измерение концентрации метаболита исходного фармацевтического ингридиента может потребоваться в следующих случаях:

- если исследуемое лекарственное средство содержит исходный фармацевтический ингредиент в виде пролекарства;
- если метаболит вносит весомый вклад (не менее 50%) в профиль безопасности или клинической эффективности данного лекарственного средства;
- если невозможно измерить концентрацию активного лекарственного вещества ввиду слишком низких его концентраций в крови, плазме или сыворотке в течение требуемого времени с точки зрения возможности достоверного аналитического определения, или если исходный фармацевтический ингредиент является нестабильным в биологических жидкостях.

Если производится измерение в моче, определяемый метаболит должен предоставлять собой основную фракцию дозы. Если измерения концентрации активных метаболитов обычно считается допустимым, то определение концентрации неактивного метаболита лишь в редких случаях можно считать обоснованным.

7. АНАЛИТИЧЕСКИЙ МЕТОД

Биоаналитическую часть испытаний биоэквивалентности следует проводить в соответствии с принципами надлежащей лабораторной практики (GLP).

Для определения концентрации действующих веществ в плазме, сыворотке или цельной крови, а также моче могут быть использованы различные методы (физико-химические, иммунологические, микробиологические и др.), обеспечивающие возможность получения достоверных лабораторных данных о концентрации действующего вещества при выбранных условиях фармакокинетического исследования, в частности, его длительности, и отвечающие общим требованиям избирательности, точности, воспроизводимости.

Если вследствие пресистемной элиминации лекарственного средства оно не обнаруживается в крови в неизмененном состоянии и не обладает фармакологической активностью (пролекарство), необходимо определять концентрацию биологически активного метаболита.

Чтобы получить достоверные результаты, которые могут быть удовлетворительно интерпретированы, биоаналитические методы, используемые для определения активной части действующего вещества и/или продукта (продуктов) его биотрансформации в плазме крови, сыворотке, крови или моче, или любом другом подходящем биоматериале, должны быть надлежащим образом охарактеризованы, полностью валидированы и документированы. Основная цель валидации метода – доказать надежность конкретного метода для количественного определения концентрации анализируемого вещества (веществ) в данном биологическом субстрате. К характеристикам биоаналитического метода, которые важны для обеспечения приемлемости его свойств и достоверности всех результатов анализа, относятся:

1) стабильность имеющихся растворов и анализируемого вещества (веществ) в биологическом субстрате в условиях обработки и в течение всего периода хранения;
2) специфичность;
3) правильность;
4) точность;
5) предел количественного определения и предел обнаружения;
6) линейный диапазон определяемых концентраций лекарственного вещества в биожидкостях.

Валидация биоаналитического метода должна состоять из двух отдельных фаз:

1) фазы, предшествующей исследованию, в ходе которой проверяется соответствие метода количественного определения шести указанным выше характеристикам; и
2) фазы самого исследования, в ходе которой валидированный биоаналитический метод применяют для реального анализа проб биоисследования в основном для того, чтобы подтвердить стабильность, правильность и точность.

Калибровочную кривую необходимо строить для каждого анализируемого вещества в каждой серии аналитических определений; ее необходимо использовать для вычисления концентрации анализируемого вещества в образцах с неизвестным содержанием в данной серии определений. Калибровочная кривая должна включать нулевой образец (blank) и 6-8 образцов с концентрациями определяемого соединения, охватывающими спектр прогнозируемых концентраций лекарства в биологических жидкостях. С периодичностью, установленной с учетом общего количества образцов, вместе с обработанными испытуемыми образцами следует анализировать ряд отдельно приготовленных для контроля качества образцов. Кроме того, необходимо валидировать способ обработки биологических образцов и обращения с ними.

Для проверки достоверности количественного определения лекарства в образцах выполняют точечный контроль, который заключается в повторном определении концентрации лекарства как минимум в 3 образцах различной концентрации с целью окончательного принятия или отклонения результатов аналитического этапа.

Все процедуры следует выполнять в соответствии с предварительно установленными стандартными рабочими методиками (СОПы). Необходимо представить и обсудить все используемые для валидации биоаналитического метода процедуры и формулы, имеющие отношение к делу. Любое изменение биоаналитического метода перед анализом исследуемых образцов и во время его проведения может потребовать адекватной ревалидации; следует сообщать обо всех изменениях и обосновывать масштаб ревалидации.

Исследования биоэквивалентности, представляемые в регистрационных досье на аналогичные по существу лекарственные препараты, которые содержат хираль-

ные действующие вещества, должны быть проведены с использованием биоаналитических методов, специфичных в отношении энантиомеров. Исключение составляют случаи, когда

1) оба препарата содержат один и тот же стабильный одиночный энантиомер;
2) оба препарата содержат рацемат, и оба энантиомера характеризуются линейной фармакокинетикой.

8. АНАЛИЗ ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИХ ДАННЫХ

Оценка биодоступности лекарственного средства или его основного биологически активного метаболита (если изучаемые препараты представляют собой пролекарства) основывается на сравнении значений фармакокинетических параметров, оцененных непосредственно по данным «концентрация (С) – время (t)» для исследуемого препарата и препарата сравнения.

Графическое представление данных фармакокинетики исследуемых (тестируемый и эталонный) препаратов может производиться как с помощью несглаженных кривых (проходящих через точки, соответствующие значениям измеренных концентраций), так и сглаженных кривых (не выходящих за пределы доверительных интервалов в каждой точке измерения).

Для минимизации погрешностей измерений следует использовать следующие методы: метод наименьших интервалов и/или метод скользящего среднего.

8.1. Параметры, подлежащие оценке

8.1.1. Однократное введение лекарственного средства

На основании первичных результатов рассчитывают необходимые параметры биодоступности, а именно: AUC_t, AUC, C_{max}, t_{max}, Ae_t, Ae (в зависимости от ситуации) или любые другие подтверждаемые параметры (см. приложение 1). Следует указать метод расчета значений AUC.

Для получения дополнительной информации можно рассчитать $t_{½}$ и MRT.

При исследованиях биоэквивалентности AUC_t наиболее достоверно отражает степень абсорбции.

Индивидуальные значения площади под кривыми «концентрация-время» – AUC (как в пределах длительности наблюдения за концентрацией лекарственного средства – AUC_t, так в в пределах от 0 до . – AUC), максимальной концентрации (C_{max},) и времени ее достижения (t_{max}) следует оценить внемодельными методами по данным «концентрация-время», установленным у каждого испытуемого для каждого из изучаемых препаратов.

Значения параметров C_{max} и t_{max} оценивают как наибольшее из измеренных значений концентрации и соответствующее время наблюдаемого максимума. Величину AUC_t рассчитывают при помощи метода обычных или логарифмических трапеций. Значения AUC определяют по формуле: $AUC = AUC_t + C_t/k_{el}$, где C_t и k_{el}, – расчетные значения концентрации лекарственного средства в последней пробе и константы элиминации, соответственно. Для вычисления C_t и k_{el} конечный (моноэкспоненциальный) участок фармакокинетической кривой описывают с помощью нелинейного регрессионного анализа.

При достаточной длительности наблюдения, когда AUC_t > 80%AUC, (см. раздел 6.4.), для оценки полноты всасывания исследуемого препарата следует использовать значения AUC_t, а при условии, что AUC_t < 80% AUC – значения AUC.

Последующий анализ фармакокинетических данных предусматривает вычисление индивидуальных отношений AUC_t или AUC, (соответственно *f'* и *f* – оценки относительной степени всасывания) и C_{max} (*f''*) – для любых лекарственных форм, отношений C_{max}/AUC_t или C_{max}/AUC как характеристик скорости всасывания – для обычных форм, а для форм пролонгированного действия - продолжительность пе-

риода времени, в течение которого концентрация лекарственного средства превышает 75% от C_{max} (T>75% C_{max}).

8.1.2. Многократное введение лекарственного средства

В случаях оговоренных в п. 4.2.2., а также в тех случаях, когда ввиду недостаточной чувствительности аналитического метода получить полноценные фармако кинетические профили после однократного введения лекарственного средства невозможно, а также когда внутрииндивидуальная вариабельность концентрации лекарственного средства при однократном введении выше, чем при его длительном введении, оценка биоэквивалентности препаратов проводится после их многократного введения.

В стационарных условиях (ss), реализующихся при повторяющемся введении лекарственных препаратов в одинаковой дозе с одним и тем же интервалом дозирования (τ), индивидуальные фармакокинетические профили следует охарактеризовать значениями площади под кривой «концентрация-время» в пределах интервала дозирования после установления стационарного распределения препарата - $AUC_{\tau,ss}$, C_{max}, $C_{max}/AUC_{\tau,ss}$ значениями минимальной концентрации (C_{min} – концентрация в конце интервала дозирования), а также значениями флуктуации (разности между значениями C_{max} и C_{min} отнесенной к средней стационарной концентрации (C_{ss}= $AUC_{\tau,ss}/\tau$). Также вычисляют индивидуальные значения отношений $AUC_{\tau,ss}$ и C_{max} для исследуемого препарата и препарата сравнения (соответственно *f'* и *f''*).

Для форм пролонгированного действия рассчитываются продолжительность периода времени, в течение которого концентрация лекарственного средства превышает среднее стационарное значение C_{ss} (T>C_{ss}), а также T>75%C_{max}.

8.2. Статистическая оценка биоэквивалентности

Оценка биоэквивалентности проводится по параметрам сравнения, выбранным в соответствии со схемой введения препарата (однократное в многократное введение) и его лекарственной формой (обычная или пролонгированного действия).

Статистический анализ проводят в предположении о лог-нормальном распределении параметров AUC_t, C_{max} и C_{max}/ AUC и нормальном распределении остальных параметров за исключением t_{max}. В предположении о лог-нормальном распределении, сравнение средних значений параметров для исследуемого препарата и препарата сравнения проводится на основе мультипликативной модели, а доверительные интервалы строятся для отношений соответствующих средних значений. После проведения логарифмического преобразования эти показатели анализируются с помощью дисперсионного анализа (ANOVA; параметрический метод).

Для обычной рандомизированной перекрестной схемы статистическая модель дисперсионного анализа должна включать следующие факторы, вносящие вклад в наблюдаемую вариацию данных:

- различия между препаратами (вариация обусловленная типом препарата),
- различия между испытуемыми (межиндивидуальные различия),
- последовательность приема препаратов (вариация обусловленная последовательностью приема препаратов),
- периоды исследования (вариация обусловленная дизайном исследования).

Дисперсионный анализ применяется для проверки гипотез о статистической значимости вклада каждого из указанных факторов в наблюдаемую вариабельность. Полученная с помощью дисперсионного анализа оценка остаточной вариации используется при расчете доверительного интервала для отношения средних значений соответствующего параметра.

Процедура статистического сравнения состоит в вычислении параметрических двусторонних 90%-ных доверительных интервалов для отношений соответствующих средних значений для исследуемого препарата и препарата сравнения.

8.3. Оценка биоэквивалентности

Препараты считаются биоэквивалентными, если:

- границы оцененного доверительного интервала для C_{max}, AUC_t или AUC, а также $AUC_{\tau,ss}$, находятся в пределах 80-125%;
- для показателей C_{max}/AUC_t, C_{max}/AUC или $C_{max}/AUC_{\tau,ss}$ характеризующихся большей вариабельностью, эти пределы составляют 75-133%;
- дисперсионный анализ не выявляет статистически значимых различий по каждому из факторов вариации данных.

Описанная процедура базируется на применении методов параметрической статистики, если распределение оцениваемых параметров нормально или логнормально, в противном случае следует пользоваться методами непараметрической статистики.

Для средств с высокой степенью вариабельности (внутрииндивидуальная вариабельность по результатам ANOVA ≥30%) границы доверительных интервалов для показателей C_{max}, AUC_t или AUC могут быть расширены с учетом терапевтической категории лекарственного средства до 75-133% с предоставлением документального обоснования данного расширения интервала.

9. ИСКЛЮЧЕНИЕ РЕЗКО ВЫДЕЛЯЮЩИХСЯ НАБЛЮДЕНИЙ

При проведении исследования биоэквивалентности может быть обнаружено, что у одного или нескольких испытуемых различия между параметрами или их отношениями значимо отличаются от таковых у основной группы (резко выделяющиеся наблюдения – «outliers»). Выявление таких наблюдений проводится при помощи специальных статистических тестов. Для демонстрации наличия таких наблюдений приводятся графики индивидуальных стандартизованных различий (центрированных по среднему значению и нормированных по стандартному отклонению).

Резко выделяющиеся наблюдения могут не приниматься в расчет при оценке биоэквивалентности при условии, что справедливость исключения этих данных доказана.

10. ПРОТОКОЛ ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ

Программа (протокол) исследования составляется в строгом соответствии с правилами надлежащей клинической практики (GCP) и должна содержать:

- сведения об исследуемых лекарственных средствах (лекарственная форма, дозировка, фирма производитель);
- сведения об испытуемых и их числе;
- план рандомизации;
- дозу и режим дозирования;
- интервал времени между приемом исследуемого препарата и препарата сравнения;
- биоматериал, в котором предполагается определять концентрацию лекарственного вещества;
- схему отбора проб и условия их хранения;
- сведения об аналитическом методе;
- сведения о методах фармакокинетического анализа;
- сведения о критериях биоэквивалентности.

11. ОТЧЕТНАЯ ДОКУМЕНТАЦИЯ

Отчет об исследовании биологической эквивалентности должен содержать всю документацию по программе (протоколу), проведению испытаний и оценкам в соответствии с надлежащей клинической практикой (GCP) испытаний лекарственных средств.

Таким образом отчет должен содержать следующую документацию:

- утвержденную программу (протокол) исследований;

- названия исследуемых лекарственных средств;
- наименование фирм-изготовителей;
- номера серий исследуемых средств и данные о сроке их годности;
- сведения о содержании действующего вещества в изученных средствах;
- демографические и клинические (если испытания проведены на больных) данные об испытуемых (анамнез заболевания, диагноз, характер поражения внутренних органов и их функциональное состояние на момент проведения исследований);
- способ введения и дозы;
- план рандомизации;
- методика отбора биоматериалов и его предварительной обработки, условия хранения проб;
- описание аналитического метода, включающего метрологические характеристики и первичные аналитические данные (например, демонстрационные хроматограммы, если использованы хроматографические методы); к отчету прилагается репрезентативное количество распечаток аналитических данных (данные полной калибровки и анализа проб полученных как минимум от 1 добровольца);
- сообщение об аналитической валидационной оценке;
- описание процедур фармакокинетического анализа и оценки биоквивалентности с указанием использованных программных средств;
- результаты определения содержания действующего вещества в биопробах, соответствующие средние значения я величины стандартных отклонений;
- индивидуальные фармакокинетические профили;
- усредненные фармакокинетические профили;
- индивидуальные значения параметров фармакокинетики, соответствующие средние значения и величины стандартных отклонений;
- средние геометрические значения лог-нормально распределенных параметров фармакокинетики, соответствующие интервальные оценки;
- индивидульные карты испытаний, содержащие демографические данные добровольцев (при проведении исследований на больных – также диагноз и номер истории болезни), сведения о дате проведения испытаний, номерах серий изученных препаратов, дозе и путях введения, а также значения основных фармакокинетических параметров.
- характеристика исследовательских баз;
- одобрение Этического комитета на проведение исследований;
- оформленные и подписанные информированные согласия добровольцев на участие в исследовании;
- образец памятки добровольца.

В отчете должны быть указаны фамилия имя и отчество ответственного исследователя (исследователей), место проведения исследования и период проведения исследования. Исследователи также должны поставить подписи под соответствующим разделом (разделами) отчета.

Должны быть указаны использованные методики расчета применявшихся фармакокинетических параметров (например, AUC) по исходным данным. При этом исключение отдельных данных следует обосновать. Если данные были подсчитаны, используя фармакокинетические модели, модель и методика расчета должна быть обоснована. Отдельные кривые зависимости «концентрация в плазме-время» могут быть построены по линейной\линейной шкале или также по линейной\логарифмической шкале. Кроме того, следует представить все отдельные данные и результаты испытания, включая и данные по испытуемым, которые были исключены из исследования. Все факты исключения испытуемых должны быть описаны и объяснены.

Статистический отчет должен быть достаточно подробным с полным описанием процедур расчета всех параметров, которые фигурируют в тексте отчета, чтобы в случае необходимости можно было повторить статистические анализы. Если применявшиеся статистические методы отклоняются от методов, указанных в программе (протоколе), должны быть указаны причины этих изменений.

Отдельно от отчета представляются результаты определения содержания действующего вещества в биопробах, соответствующие средние значения и величины стандартных отклонений на электронном носителе.

12. ФАРМАКОДИНАМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Фармакодинамические исследования на здоровых добровольцах или пациентах могут быть использованы для установления эквивалентности между двумя лекарственными средствами. Это может быть необходимо, если лекарственное средство и/или его метаболит (метаболиты) в плазме или моче не могут быть определены количественно с достаточной точностью и чувствительностью. Кроме того, фармакодинамические исследования на людях необходимы в тех случаях, когда измерения концентраций лекарственного средства не может продемонстрировать эффективность и безопасность конкретного лекарственного средства. Например, это относится к препаратам местного применения, у которых не ожидается, что лекарственное средство будет абсорбировано в системное кровообращение.

При фармакодинамических исследованиях условия, в которых они проводятся, должны строго контролироваться, так же, как и при исследовании биологической эквивалентности. Эти условия должны отвечать требованиям надлежащей клинической практики (GCP) для испытаний лекарственных средств.

При планировании, проведении и оценке результатов исследования должны соблюдаться следующие требования:

- измеряемая реакция должна представлять собой фармакологический или терапевтический эффект, подтверждающий эффективность и\или безопасность лекарственного средства;
- методика должна быть валидирована с точки зрения точности, воспроизводимости, специфичности и достоверности;
- ни испытуемое, ни эталонное лекарственные средства не должны вызывать максимальную реакцию в ходе исследования, поскольку может оказаться невозможным выявить различия между действующими веществами, применяемыми в дозах, которые вызывают максимальные или близкие к максимальным эффекты; изучение взаимодействия «доза-реакция» может стать необходимой частью исследования;
- реакция должна измеряться количественно двойным слепым методом и результаты должны записываться с помощью соответствующего прибора с воспроизведением, чтобы обеспечить регистрацию фармакодинамических явлений, которые заменяют концентрацию в плазме. Когда такие измерения невозможны, можно провести регистрацию по шкале визуальных аналогов, а если данные ограничены качественными показателями (с разделением на категории), потребуется специальный статистический анализ;
- испытуемые, не реагирующие на лекарственное средство, должны быть исключены из исследования после предварительного скрининга, и в программе (протоколе) должны быть указаны критерии, по которым идентифицируются реагирующие и не реагирующие испытуемые;
- если возможен серьезный плацебо-эффект, в схему испытания можно внести поправку на этот эффект посредством включения лечения плацебо в качестве третьей фазы в этой схеме;

- в схеме исследования должна быть предусмотрена лежащая в основе патология и история болезни и приведена информация о воспроизводимости исходных условий
- если не пригоден перекрестный метод исследования необходимо использовать метод параллельных групп.

В исследованиях, в которых регистрируют непрерывные переменные, изменение интенсивности действия лекарственного средства, наблюдаемое в течение некоторого промежутка времени, может быть описано таким же образом, что и в исследовании для измерения концентрации препарата в плазме. Можно вывести параметры, описывающие площадь под кривой «эффект-время», максимальную реакцию и время, когда происходит эта реакция.

Статистические методы, применяемые для оценки результатов исследования, в основном, те же, что и при исследованиях биологической эквивалентности. Однако, следует сделать поправку на потенциальную нелинейность взаимосвязи между дозой и площадью под кривой «эффект-время», построенной по результатам исследования «доза-реакция». Однако, следует отметить, что обычный допустимый диапазон для оценки биологической эквивалентности, как правило, слишком широк и поэтому неприемлем; в связи с этим его необходимо определять на основании ситуационного анализа и описывать в программе (протоколе).

13. КЛИНИЧЕСКИЕ ИСПЫТАНИЯ

Для некоторых лекарственных средств и форм кривые зависимости «концентрация в плазме - время» не пригодны для оценки эквивалентности двух действующих веществ. Также не могут быть проведены и фармакодинамические исследования из-за отсутствия значимых и измеримых фармакодинамических параметров. В этих обстоятельствах для демонстрации эквивалентности двух препаратов необходимо проведение клинических испытаний. При таком клиническом испытании применяются те же статистические принципы, что и при исследовании биологической эквивалентности. Число пациентов, включенных в исследование, будет зависеть от вариабельности планируемых параметров и допустимого диапазона, и обычно намного больше, чем это требуется при исследовании биологической эквивалентности.

В программе (протоколе) проведения таких испытаний должны быть четко определены следующие положения:

- контрольные параметры: обычно это важные конечные клинические результаты, на основании которых могут быть рассчитаны интенсивность и начало проявления реакции организма, если это существенно;
- масштаб допустимого диапазона: его следует определять на основе ситуационного анализа, принимая во внимание специфические клинические условия, например, естественное течение заболевания, эффективность доступных методов лечения и выбранный запланированный параметр. В отличии от исследования биологической эквивалентности (где используется стандартный допустимый диапазон), масштаб допустимого диапазона в клинических испытаниях не может базироваться на общей согласованности по всем терапевтическим классам и показаниям;
- использованные статистические методы: в настоящее время общепринятым является метод определения доверительного интервала, при этом главная проблема заключается в том, чтобы исследуемый препарат не уступал эталонному более чем на строго заданную величину. Поэтому целесообразен расчет одностороннего доверительного интервала (для эффективности и/или безопасности). Доверительный интервал может быть получен параметрическим или непараметрическим методами.

Там где это возможно, в схему испытания следует включить этап плацебо, и иногда целесообразно включить в завершающие сравнительные испытания анализ конечных результатов по оценке безопасности.

14. ТЕСТ СРАВНИТЕЛЬНОЙ КИНЕТИКИ РАСТВОРЕНИЯ IN VITRO (ИСПЫТАНИЕ НА РАСТВОРЕНИЕ)

Сравнительные исследования по оценке растворимости in vitro ("вне живого организма") должны выполняться как дополнение к исследованию in vivo. Таким образом, анализ растворимости in vitro ("вне живого организма"), как единственная информация об эквивалентности неприменим для лекарственных средств и форм, перечисленных в качестве примера 4.2.1.-1) пп. а)-f). Этот показатель может применяться при испытаниях лекарственных средств перечисленных в п. 4.2.2.

Лекарственное средство состоит из лекарственного вещества и вспомогательных веществ. Соотношение между ними, вид вспомогательных веществ и способ производства готового лекарственного средства должны быть выбраны на основании состава, физико-химических и объемных свойств лекарственного препарата, а также его способности к абсорбции. Все это в целом придает каждому препарату определенные характеристики растворения.

В ходе разработки лекарственного средства испытание на растворение используют в качестве средства идентификации факторов состава, которые влияют и могут оказывать решающее влияние на биодоступность лекарственного средства. Как только определены состав и процесс производства, испытание на растворение используют при контроле качества серий, произведенных при масштабировании процесса, и промышленных серий, чтобы обеспечить уверенность как в постоянстве от серии к серии, так и в том, что профили растворения остаются подобными профилям растворения серий, используемых для проведения клинических испытаний. Кроме того, испытание на растворение может быть использовано для подтверждения биодоступность нового лекарственного средства, биоэквивалентности по существу аналогичного препарата или при внесении изменений в состав и технологию производства.

Таким образом, исследования сравнительной кинетики растворения in vitro могут служить для нескольких целей:

1. обеспечение качества:
    - для получения информации об испытуемых сериях, используемых в исследованиях биодоступности/биоэквивалентности и основных клинических исследованиях, чтобы подтвердить показатели с целью контроля качества;
    - для использования при контроле качества как способ доказательства постоянства при производстве;
    - для получения информации о препарате сравнения, используемом в ходе исследований биодоступности/биоэквивалентности и основных клинических исследований.
2. в качестве замены заключения о биоэквивалентности
    - для доказательства подобия референтных препаратов;
    - для доказательства подобия между различными составами препарата (с изменениями и новыми, включая по существу аналогичные препараты) и референтным лекарственным препаратом;
    - для сбора информации о постоянстве от серии к серии препаратов (испытуемого и референтного), которые будут использованы при выборе приемлемых серий для исследования in vivo.

Методология проведения испытания должна соответствовать фармакопейным требованиям, если не показано, что эти требования являются неподходящими. Могут быть рассмотрены альтернативные методы, если обосновано, что они явля-

ются селективными и с их помощью можно отличить серии с приемлемыми и неприемлемыми характеристиками in vivo.

Если действующее вещество считается хорошо растворимым, справедливо ожидать, что не будет никаких проблем относительно биодоступности, если еще и лекарственная форма быстро растворяется в физиологическом интервале pH, предполагаемом после введения препарата. В таких случаях можно отказаться от исследования на основании аналогичного случая изучения препарата и подобия профилей растворения, которые получены при селективных испытаниях, а также при условии соблюдения других критериев исключения, изложенных в пп. 4.2.2. Подобие должно быть обосновано с помощью профилей растворения, содержащих не менее трех точек контроля и полученных в трех различных буферных растворах – в интервале pH 1-6,8, если необходимо, интервал pH должен составлять от 1 до 8).

В случае лекарственного препарата или вспомогательных веществ, не чувствительных к pH (неионизируемые соединения, хорошо растворимые в воде), требуются профили только в двух буферных растворах.

Если лекарственное вещество имеет плохую растворимость и высокую липофильность (и, как следствие, высокую проницаемость через биологические мембраны), то фактором, ограничивающим скорость абсорбции, может быть растворение лекарственной формы. Это также имеет место в том случае, когда одно или несколько вспомогательных веществ обеспечивают контролируемое высвобождение и последующее растворение действующего вещества. В таких случаях рекомендуются различные условия испытания; следует проводить адекватный отбор проб до тех пор, пока либо не растворится 90% лекарственного вещества, либо не будет достигнута асимптота. Знание характеристик растворения при различных условиях (например, pH, перемешивание, ионная сила, присутствие поверхностно-активных веществ, вязкость, осмотическое давление) является важным, поскольку поведение твердой системы in vivo может быть критическим для растворения лекарственного препарата независимо от физико-химических свойств действующего вещества. Для исследования критических параметров и для оптимизации таких условий может быть использовано соответствующее экспериментальное статистическое планирование.

Для подтверждения подобия профилей растворения приемлемы любые методы при условии, что они обоснованы и валидированы.

Подобие может быть установлено путем сравнения результатов, полученных модельно-зависимыми и модельно-независимыми методами, например, с помощью линейной регрессии количества вещества (в процентах), растворенного к определенным моментам времени, с помощью статистического сравнения параметров функции Вейбулла (Weibull function) или с помощью вычисления коэффициента подобия (фактора сходимости), например, как описано ниже:

$$f_2 = 50 \times \lg\left\{\left[1 + \frac{1}{n} \times \sum \left(\overline{R_i} - \overline{T_i}\right)^2\right]^{-0,5} \times 100\right\}$$

В этом уравнении:

f_2 – коэффициент подобия (фактор сходимости);

n – число временных точек контроля;

R_t - количество лекарственного средства, перешедшего в раствор из препарата сравнения (референтного препарата) в i-той временной точке, %;

T_t - количество лекарственного средства, перешедшего в раствор из испытуемого препарата в i-той временной точке, %.

Оценка подобия основана на следующих условиях:

- не менее трех временных точек контроля (для препаратов с контролируемым высвобождением действующего вещества - не менее 5);
- 12 отдельных значений в каждой временной точке контроля для каждого пре-

парата;

- не более одного среднего значения, превышающего 85% для каждого состава;
- относительное стандартное отклонение среднего значения для каждого препарата должно быть менее 10%, начиная со второй и до последней временной точки контроля.

Значение критерия f_2 должно лежать в пределах 50-100, что подтверждает подобие (эквивалентность) двух профилей растворения. Если более 85% лекарственного препарата растворяется в течение 15 мин, профили растворения могут быть признаны подобными без последующей математической оценки.

Если этот тест проводят для контроля качества лекарственного средства, информацию о растворимости in vitro необходимо внести в документацию, представляемую на регистрацию.

15. КЛИНИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫЕ КОЛЕБАНИЯ БИОДОСТУПНОСТИ, ОБУСЛАВЛИВАЮЩИЕ ОТКАЗ В РЕГИСТРАЦИИ ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА

Новое лекарственное средство, биологическая доступность которого находится за пределами допустимого размаха варьирования при соспоставлении с существующим лекарственным средством не является взаимозаменяемым. Регистрация препарата с более низкой биодоступностью не может быть произведена по соображениям эффективности. Напротив, реализация лекарственного средства с более высокой биодоступностью (сверхбиодоступность) не может быть разрешена из соображений безопасности. В этом случае возможны два варианта решения проблемы:

1. Если состав лекарственного средства со сверхвысокой доступностью изменен таким образом, что он стал биоэквивалентным существующему лекарственному средству, он может считаться взаимозаменяемым препаратом. Однако это решение может оказаться не идеальным, поскольку действенность лекарственных форм с более низкой биодоступностью имеет склонность к изменениям.

2. Лекарственная форма с повышенной биодоступностью, в которой содержание действующего вещества снижено, может рассматриваться как новая (усовершенствованная) лекарственная форма, но это решение обычно требует подтверждения данными клинических испытаний. Такое лекарственное средство не должно считаться взаимозаменяемым с существующим препаратом, и обычно оно становится эталонным продуктом для будущих взаимозаменяемых лекарственных средств. Название нового лекарственного средства должно быть таким, чтобы его нельзя было спутать с прежним одобренным лекарственным средством (средствами).

ПРИЛОЖЕНИЕ 1.

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

C_{max} – наблюдаемый максимум или пик концентрации лекарственного средства (или метаболита) в плазме, сыворотке или крови.

C_{min} – минимальная концентрация в плазме.

C_{max}-ratio – соотношение геометрических средних величин Cmax анализируемых и эталонных препаратов

C_{ss} – концентрация лекарственного вещества при стационарных (равновесных) условиях

C_{av} – средняя концентрация в плазме крови

AUC – площадь под кривой зависимости концентрации лекарственного средства (или метаболита) в плазме (или сыворотке) или в цельной крови от времени. Величина AUC может быть отнесена к конкретному промежутку времени, например AUC для периода от 0 до 12 ч изображается как AUC_{12}

AUC_t – AUC от нуля до последней количественно оцениваемой концентрации

AUC_{∞} – AUC от нуля до бесконечности, определяется экстраполяцией

$AUC_{t,ss}$ – AUC для интервала между приемами лекарственного средства (τ) в стационарном состоянии

AUC-ratio – соотношение геометрических средних AUC-величин анализируемых и эталонных препаратов

Ae – степень кумулятивного извлечения исходного лекарственного средства (или метаболита) из мочи. Величина Ae может быть определена для конкретного промежутка времени, например Ae от 0 до 12 ч может быть выражена как Ae_{12}

Ae_t – Ae от нуля до последней количественно оцениваемой концентрации

Ae_{∞} – Ae от нуля до бесконечности, определяется экстраполяцией

$Ae_{t,ss}$ – Ae для интервала между приемами лекарственного средства в стационарном состоянии

dAe/dt – степень экскреции исходного лекарственного средства (или метаболита) с мочой

t – время от момента приема (введения) лекарственного средства

t_{max} – время после введения лекарственного средства, в которое отмечается C_{max}

t_{max}-diff – разность между арифметическими средними t_{max} величин анализируемого и эталонного препаратов

$T_{½}$ – период полувыведения лекарственного вещества из плазмы (сыворотки, цельной крови)

MRT – среднее время удержания

f – относительная степень всасывания (относительная биодоступность) лекарственного вещества, определяемая отношением $AUC_{t,T}/AUC_{t,R}$ (в процентах), для испытуемого препарата (T) и препарата сравнения (R)

f' – относительная степень всасывания лекарственного вещества, определяемая отношением $AUC_{,T}/AUC_{,R}$ (в процентах), для испытуемого препарата (T) и препарата сравнения (R)

f'' – относительная степень всасывания лекарственного вещества, определяемая отношением $C_{max,T}/C_{max,R}$ (в процентах), для испытуемого препарата (T) и препарата сравнения (R)

P – уровень вероятности, при котором статистическая гипотеза верна

T – длительность наблюдения за концентрацией лекарственного вещества

t – интервал дозирования при многократном приеме (введении) лекарственного средства

ПРИЛОЖЕНИЕ 2.

ПЕРЕЧЕНЬ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ, ДЛЯ КОТОРЫХ ДОПУСКАЕТСЯ ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ БИОЭКВИВАЛЕНТНОСТИ НА КРУПНЫХ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

№	Фармакотерапев-тическая группа	МНН	Доза$_{min}$, мг	Доза$_{max}$, мг	T_{max}, ч	$T_{½}$, ч
1	Нейролептики	хлорпромазин*	25	75	2-4	61 сут
		левомепромазин	25	50	1-3	15-78
		галоперидол	1,5	4,5	2-6	13-40
		сульпирид	200	600	4,5	7
2	Антиконвульсанты	этосуксимид	250		1-4	60 ч
		карбамазепин*	100	200	4-8	15
		вальпроевая кислота	150		2-3	8-20
3	Снотворные	фенобарбитал	100	10	1-2	2-10
		нитразепам*	5	15	1-4	26
		зопиклон	7,5	15	1-3	3,5-6
		мидазолам	7,5	100	0,5	1,5-2,5
4	Миорелаксанты	толперизон	50	25	0,5-1,0	1,5
		баклофен	10	25	2-3	4
5	Антидепрессанты	амитриптилин*	10	25	2-7,7	9-25
		мапротилин*	10	20	8	43-45
6	Транквилизаторы	феназепам	10			10-18

Примечание: средства помеченные знаком (*) исследуются также по активному метаболиту.

ПРИЛОЖЕНИЕ 3.

ОБРАЗЕЦ ФОРМЫ ИНФОРМИРОВАННОГО СОГЛАСИЯ ДОБРОВОЛЬЦА НА УЧАСТИЕ В ИСПЫТАНИЯХ БИОЭКВИВАЛЕНТНОСТИ/БИОДОСТУПНОСТИ

Я,____, ___________

паспорт: серия _________№____________________выдан «____» __________ _____г.

____

проживающий по адресу____

внимательно ознакомился с информацией о целях и правилах проведения исследования и добровольно соглашаюсь участвовать в исследовании биоэквивалентности препарата ________________________________, производства фирмы _____________ ___________, в сравнении с препаратом __________________________, производства фирмы ____.

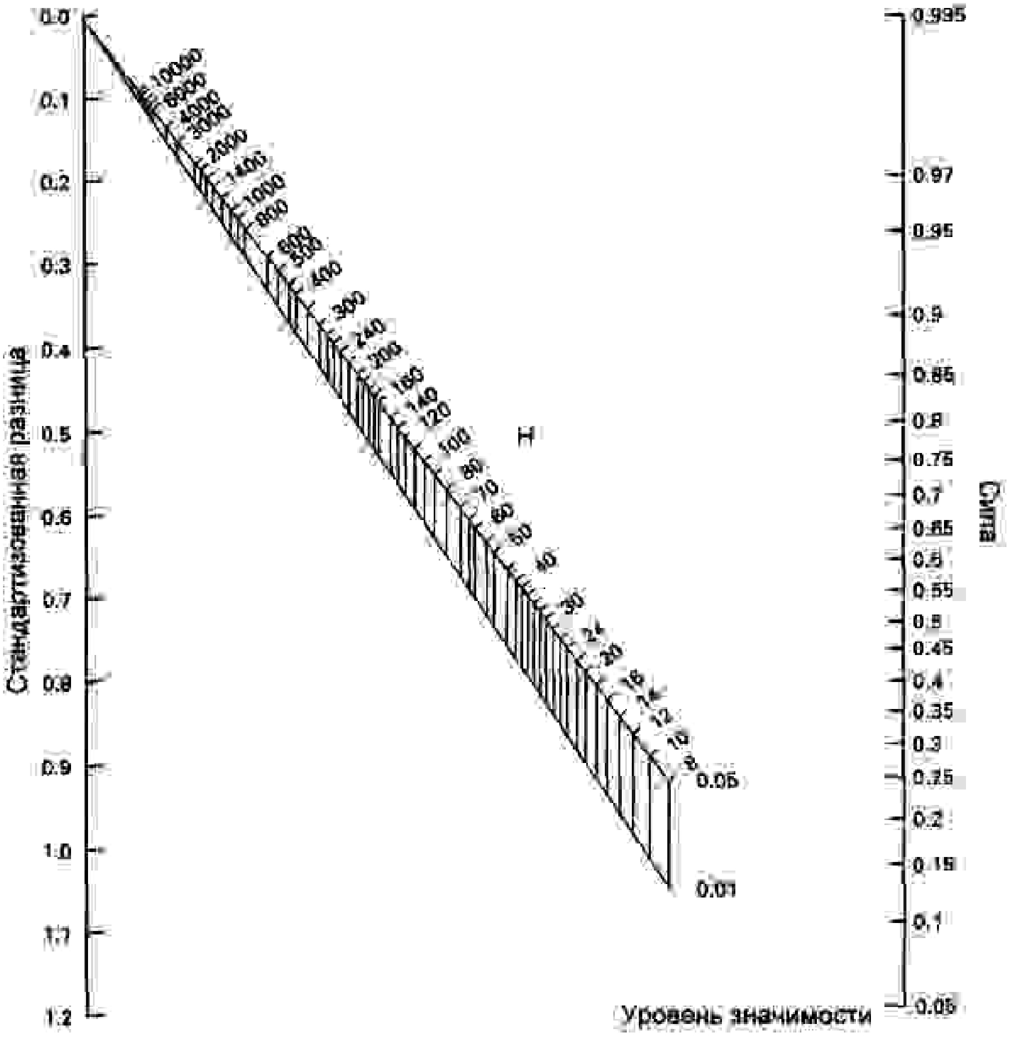
1. Я получил полное объяснение врача-исследователя _________________________ относительно целей и продолжительности исследования, а также того, что от меня требуется.
2. Я информирован о том, что на момент проведения исследования лекарственный препарат не имеет номера государственной регистрации.
3. Я предупрежден о том, что данное исследование может сопровождаться некоторым дискомфортом, и в его процессе не исключено какое-либо вредное воздействие на мое здоровье или самочувствие.
4. Я получил возможность задать любые интересующие меня вопросы врачу-исследователю по всем аспектам исследования. Я понял все данные мне рекомендации и в меру моих знаний осознал полученную информацию.
5. Я согласен, чтобы врач-исследователь обратился к моему лечащему врачу и известил последнего о моем участии в исследовании. Я разрешаю моему лечащему врачу сообщить в конфиденциальном порядке о состоянии моего здоровья, вредных привычках и перенесенных заболеваниях врачу-исследователю.
6. Я согласен подчиняться инструкциям, получаемым в течение исследования, добросовестно сотрудничать с врачом-исследователем и немедленно сообщать ему о любого рода нарушениях со стороны моего здоровья, изменениях моего самочувствия и информировать его обо всех неожиданных или необычных симптомах, когда бы они не возникли.
7. Я согласен, чтобы информация, полученная в ходе исследования, использовалась в полной мере и передавалась в Фармакологический государственный комитет и Министерство здравоохранения РБ, а также в организацию, по заказу которой проводится исследование.
8. Я извещен, что имею полное право в любой момент прекратить свое участие в исследовании без необходимости обосновывать свое решение. Мой отказ от участия в исследовании не повлечет за собой изменения отношения ко мне медицинского персонала.
9. В случае моего решения о прекращении участия в исследовании биоэквивалентности, я обязуюсь информировать об этом врача-исследователя для того, чтобы предоставить ему возможность оценить мое состояние и дать необходимые рекомендации.
10. Если моему здоровью или благополучию будет причинен ущерб, непосредственно связанный с моим участием в исследовании, спонсор исследования выплатит мне компенсацию. Если виновность спонсора доказана, денежное выражение этой компенсации должно устанавливаться белорусскими судебными органами в соответствии с существующими нормами. Сумма компенсации может быть пересмотрена в случае моей частичной вины в возникновении данного ущерба.
11. Мне была предоставлена копия данного информированного согласия. Я согласен принять участие в исследовании.

Ф.И.О. добровольца: ____________________ Подпись _____________ Дата ______

Подтверждаю, что подробно объяснил сущность, цель и возможный риск данного исследования добровольцу.

Ф.И.О. врача-исследователя: _____________ Подпись _____________ Дата ______

ПРИЛОЖЕНИЕ 4.
НОМОГРАММА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДОСТАТОЧНОГО ЧИСЛА ДОБРОВОЛЬЦЕВ ПО РЕЗУЛЬТАТАМ ПРОВЕДЕННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ.



По. Gore, Altman Statistics in Practice. – Brit. Med. Assoc. – London, 1982. – P. 7

Пример: При проведении исследования биоэквивалентности на 18 добровольцах показатели AUC_t для испытуемого препарата составили 288,53±55,86 нг×ч/мл, а для препарата сравнения 259,93±40,78 нг×ч/мл.

Таким образом, ожидаемое выявляемое отличие составляет:

$$\left|AUC_{t,R} - AUC_{t,T}\right| = \left|259{,}93 - 288{,}53\right| = 28{,}6$$

стандартное отклонение для этого отличия:

$$\frac{s_R + s_T}{2} = \frac{55{,}86 + 40{,}78}{2} = 48{,}32$$

стандартизированная разница, таким образом составит:

$$\text{Станд.разница} = \frac{\text{выявл.отличие}}{\text{ст.отклонение}} = \frac{28{,}6}{48{,}32} = 0{,}59$$

Выбирая 0,8 за значения мощности (силы), следует соединить значения 0,59 слева и 0,8 справа. Линия пересечет диагональ для α=0,05 на числе 90. Таким образом – 90 минимальное число пациентов, которые должны быть включены в исследование для выявления данного различия.

Для расчета мощности настоящего исследования необходимо соединить линией стандартизированную разницу 0,59 слева и реальное число участников – 18 человек для настоящего исследования – на диагонали. Продолжение линии пересечет шкалу для мощности (силы) в точке 0,22. Таким образом, мощность настоящего исследования – 22%.

ПРИЛОЖЕНИЕ 5.

БИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КЛАССИФИКАЦИОННАЯ СИСТЕМА (БКС)

БКС основана на водорастворимости и способности лекарственных субстанций абсорбироваться в кишечнике. Она классифицирует все активные фармацевтические ингредиенты на 4 класса:

- Класс I – хорошо растворимые, с высокой степенью абсорбции
- Класс II – плохо растворимые, с высокой степенью абсорбции
- Класс III – хорошо растворимые, с низкой степенью абсорбции
- Класс IV – плохо растворимые, с низкой степенью абсорбции

Хорошо растворимые лекарственные средства

Активные фармацевтические ингредиенты считаются хорошо растворимыми если самая высокая дозировка средства в виде твердой пероральной дозированной формы растворяется в 250 мл или менее водной среды в пределах интервала значений pH от 1,2 до 6,8. Профиль растворимости активного фармацевтического ингредиента должен определяться при температуре 37 ± 1°C и в водной среде. Рекомендуется минимум три повторных определения растворимости при каждом значении pH.

Генерический продукт считается **очень быстро растворимым** в случае когда не менее чем 85% от заявленного содержания лекарственной субстанции растворяется в течение15 минут или менее при применении лопастного аппарата (75 rpm) или корзинки (100 rpm) в объеме 900 мл или менее в каждой из следующих сред: раствор HCl pH 1,2; ацетатный буфер pH 4,5 и фосфатный буфер pH 6,8.

Генерический продукт считается **быстро растворимым** в случае когда не менее чем 85% от заявленного содержания лекарственной субстанции растворяется в течение30 минут или менее при применении лопастного аппарата (75 rpm) или корзинки (100 rpm) в объеме 900 мл или менее в каждой из следующих сред: раствор HCl pH 1,2; ацетатный буфер pH 4,5 и фосфатный буфер pH 6,8.

Средства с высокой степенью абсорбции

Активное фармацевтическое вещество считается обладающим высокой степенью кишечной абсорбции в случае если степень всасывания у человека составляет ≥85%, основываясь на определении баланса относительной биодоступности, либо в сравнении с внутривенным путем введения данного средства. Приемлемые альтернативные методы для определения растворимости включают в себя:

- кишечная перфузия in vivo у людей, или
- определение проницаемости in vitro с использованием культур клеток и тканей человека или животных.

Когда используется один из этих двух методов для определения проницаемости, должна быть продемонстрирована приемлемость методологии, включая определение проницаемости сравнительно с проницаемостью референтного препарата, для которого было доказано, что абсорбируемая фракция дозы составляет не менее 85%.

Подтверждающие данные должны быть предоставлены путем применения также следующих вспомогательных методов:

- кишечная перфузия in vivo или in situ с использованием животных моделей, или
- in vivo проницаемость через монослой эпителиальных культурированных клеток (например, Caco-2) используя валидированную методику с активным фармацевтическим ингредиентом известной проницаемости,

однако данные из двух последних методик не считаются приемлемыми в случае если они являются единственным из представленных доказательств высокой степени абсорбции. В этих экспериментах высокая проницаемость оценивается относительно высокой проницаемости ряда средств сравнения с доказанной проницаемостью и уровнем абсорбируемой фракции.

ПРИЛОЖЕНИЕ 6.

ОСНОВНАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Методических указаний «Проведение качественных исследований биоэквивалентности лекарственных средств» / И.Б. Бондарева, В.Б. Герасимов, А.П. Дрожжин и др, утвержденных Министерством здравоохранения и социального развития Российской Федерации 10.08.2004 г.;
2. Руководства 42-7.1:2005 «Руководство по клиническим исследованиям. Лекарственные средства. Исследование биодоступности и биоэквивалентности.» - Министерство здравоохранения Украины, Киев. – 2005 г.;
3. Соловьев В.Н., Фирсов А.А., Филов В.А. Фармакокинетика. – М.: Медицина, 1980. – 423 с.
4. Фирсов А.А., Пиотровский В.К. Фармакокинетические методы в биоинформации. Итоги науки и техники. – М.: ВИНИТИ, 1984. – Т.14. – С. 114-227.
5. Amidon G.L., Lennernas H., Shah V.P., Crison J.R. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: The correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability // Pharm. Res. – 1995. – Vol. 12. – P. 413-420.
6. Bioavailiability assessment from pharmacologic data: Method and clinical evaluation / G. Stagni, A.M.M. Shepherd, Yanjuan Liu, W.R. Gillespie // J. Pharmacokinet. Biopharm. – 1997. – Vol. 25, №3. – P. 349-362.
7. Bioequivalence Assesment. Methods and Applications / Steinijans V.W. // Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. & Toxicol. – Vol. 30 (Suppl. 1). – 1992. – P. 1-66.
8. Bioequivalence Studies: Single vs Multiple Dose / Steinijans V.W., Sauter R., Jonkman H.G. et al. // Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. & Toxicol. 1989. – Vol. 27. – P. 261-266.
9. Biopharmaceutics Classification System: The scientific basis for biowaiver extensions / Yu L.X., Amidon G.L., Polli J.E., et al. // Pharm. Res. – 2002. – Vol. 19. – P. 921-925.
10. Biowaiver monographs references: examples // J. Pharm. Sci. – 2004. – Vol. 93, № 8. – P. 1945-1956; J. Pharm. Sci. – 2005. – Vol. 94, № 7. – P. 1389-1395; J. Pharm. Sci. – 2005. – Vol. 94, № 8. – P. 1611-1617.
11. CPMP/EWP/QWP/1401/98 Note for Guidance on the Investigation of Bioavailability and Bioequivalence. – London, 2001. – P. 1-40.
12. Diletti E., Hauschke D., Steinijans V.W. Sample size determination for bioequivalence assessment by means of confidence intervals // Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. & Toxicol. – 1991. – Vol. 29. – P. 1-8.
13. Guidance on the selection of comparator pharmaceutical products for equivalence assessment of interchangeable multisource (generic) products. 36th Report of the WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. – WHO Technical Report Series. - № 902. – 2002. – P. 161-180.
14. Guideline for bioequivalence studies of generic products (Japan). http://www.nihs.go.jp/drug/be-guide(e)/Generic/be97E.html
15. Hauschke D., Steinijans V.W., Diletti E.A. Distribution-free Procedure for the Statistical Analysis of Bioequivalence Studies // Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. & Toxicol. – 1990. – Vol. 28. – P. 72-78.
16. HHS/FDA Guidance for Industry: Waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system. – Aug. 2000. http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm
17. In vitro dissolution profile comparison. Statistics and Analysis of the Similarity factor, f_2 / Shah V.P., Tsong Y., Sathe P., Liu J.P. // Pharm. Res. – 1998. – Vol. 15. – P. 889-896.
18. In vivo Bioequivalence Guidances. – U.S. Pharmacopeia 24-NF 19< Supplement 2. – 2000. – 1090, P. 2056-2098.
19. Investigation of Bioavailability and Bioequivalence. – Commission of the European Communities. – III/54/89-EN. – Dec. 1991. – P. 1-20.

20. Jawien W. On continuity of integration methods for AUC: A note // J. Pharmacokinet. Biopharm. – 1998. – Vol. 26, №1. – P. 125-130.
21. Lindenberg M., Kopp S., Dressman J.B. Classification of orally administered drug on the World Health Organization model list of essential medicines according to the biopharmaceutics classification system // Eur. J. Pharmaceutics and Biopharm. – 2004. – Vol. 58. – P. 265-278.
22. Lund R.E. Tables for an Approximate Test for Outliers in Linear Models // Technometrics. – 1975. – Vol. 17. – P. 473-476.
23. Midha K.K., Rawson M.J., Hubbard J.W. Commentary: The Role of Metabolites in Bioequivalence // Pharmaceutical Research. – 2004. – Vol. 21. – P. 1331-1344.
24. Molecular Properties of WHO Essential Drugs and Provisional Biopharmaceutical Classification / Kasim N.A., Whitehouse M., Ramachandran C. et al. // Molecular Pharmaceutics. – 2004. – Vol. 1. – P. 85-96.
25. Moore J.W., Flanner H.H. Mathematical comparison of curves with an emphasis on in vitro dissolution profiles // Pharm. Tech. – 1996. – Vol. 20, № 6. – P. 64-74.
26. Schuirmann D.J. A comparison of the two one-side tests procedure and the power approach for assessing the equivalence of average bioavailability // J. Pharmacokinet. Biopharm. – 1987. – Vol. 15. – P. 657-680.
27. Steinijans V.W., Diletti E. Statistical Analysis of Bioavailability Studies: Parametric and Nonparametric Confidence Intervals // Eur. J. Clin Pharmacol. – 1983. – Vol. 24. – P. 127-136.
28. Tothfalusi L., Endrenyi L. Limits for scaled average bioequivalence of highly variable drugs and drug products // Pharmaceutical Research. – 2003. – Vol. 20. – P. 382-389.
29. Tothfalusi L., Endrenyi L., Midha K.K., Rawson M.J., Hubbard J.W. Evaluation of bioequivalence of highly variable drugs // Pharmaceutical Research. – 2001. – Vol. 18. – P. 728-733.
30. Waiver of in vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System. – U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administartion, Center for Drug Evaluation and Research. – Aug. 2000.

ПЕРЕЧЕНЬ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ (ЛЕЧЕБНЫХ) ДОЗ СРЕДСТВ НА ОСНОВЕ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ

Ниже приводится перечень стандартных суточных доз (DDD) препаратов на основе лекарственного растительного сырья. Для пересчета на величину разовой дозы препарата, следует учитывать кратность приема препарата в сутки, заявленную производителем в инструкции по применению препарата.

Пример 1. Пересчет показателя DDD в разовую дозу препарата.
Препарат Х на основе сухого экстракта Клопогона кистевидного (Cimicifuga racemosa L.) 20 мг в таблетке принимается по 1 таблетке 2 раза в сутки.
Расчет разовой дозы: DDD=40 мг; разовая доза=40:2=20 мг
ЗАКЛЮЧЕНИЕ: Разовая доза соответствует рекомендуемой терапевтической дозе.

В случае, если соотношение компонентов в указанной галеновой форме препарата отличается от рекомендованной активности следует проводить коррекцию рекомендуемой стандартной суточной дозы по формуле: **DDD_{ref}´R_{ref}:R_x**, где R_{ref} – соотношение компонентов стандартной формы, а R_x – исследуемой формы.

Пример 2. Пересчет показателя DDD для препарата с иным соотношением компонентов.
Препарат Y на основе настойки Тимьяна обыкновенного (Thymus vulgaris L.) с соотношением компонентов сырья 3:7.
Расчет DDD: DDD_{ref}=2 мл из расчета сырья 1:10. Искомая DDD=$2мл \times \frac{1}{10} \div \frac{3}{7}$=0,47 мл.
ЗАКЛЮЧЕНИЕ: Стандартная суточная доза препарата Y составляет 0,47 мл.

В случае, если галеновая форма препарата не указана в данной таблице, примерную стандартную дневную дозу можно пересчитать из дозы сухого сырья по формуле **DDD_{ref}:R_x**, где R_x – соотношение компонентов исследуемой формы

Пример 3. Расчет показателя DDD для галеновой формы с известным соотношением компонентов.
Препарат Z на основе настойки листа крапивы двудомной (Urtica dioica L.) с соотношением компонентов сырья 2:5.
Расчет DDD: DDD_{ref}=8,0-12,0 г сухого сырья. Искомая DDD= от $8г \div \frac{2}{5}$=20 г до $12г \div \frac{2}{5}$=30 г.
ЗАКЛЮЧЕНИЕ: Стандартная суточная доза препарата Z составляет 20-30 г.

Для препаратов на основе фиксированных комбинаций лекарственного растительного сырья следует использовать таблицу 2. При отсутствии в таблице сведений по указанной комбинации дозы каждого компонента рассматриваются как доза монокомпонентного препарата, за исключением случаев представления в регистрационном досье отчета по оценке величины ED_{50} для комбинации.

Если в регистрационном досье препарата имеется отчет об оценке показателя ED_{50} для комбинации, то доза каждого компонента лекарственного сырья может быть рассчитана по формуле $DDD \times \frac{ED_{50}mono}{ED_{50}combin}$, где DDD – стандартная дневная доза монопрепарата, ED_{50}mono – медианная эффективная доза монопрепарата, ED_{50}combin – медианная эффективная доза комбинированного препарата, определенные методом пробит-анализа.

ТАБЛИЦА 1. ПЕРЕЧЕНЬ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ (ЛЕЧЕБНЫХ) ДОЗ МОНОКОМПОНЕНТНЫХ СРЕДСТВ

№	Латинское название	Русское название	Часть	Форма	DDD	Примечание	Ист.
1.	Achillea millefolium	Тысячелистник	лист трава цветки	сухое сырье настой эфир. масло сухое сырье сок сухое сырье	5-30 г 29,57-59,14 мл 0,25-1,0 мл 4,5 г 45 мл 3,0 г	 Разовая доза. Из расчета сырья 1:16 Разовая доза	[10] [1] [1] [11] [11] [11]
2.	Achyranthes aspera L.	Горец перечный	побеги, листья, корень	сухое сырье	62,206 г	Разовая доза	[10]
3.	Acorus calamus	Аир болотный	корневище	сухое сырье настой настойка	1296-2592 мг 118,28-177,42 мл 0,31-1,85 мл	Разовая доза Разовая доза. Из расчета сырья 3:32 Разовая доза. Из расчета сырья 1:5	[1] [1] [1]
4.	Adonis vernalis L.	Адонис весенний	трава	порошок	0,6 г		[11]
5.	Aesculus hippocastanum L.	Каштан конский	семя	сух. экстракт гель	250-312,5 мг 2%	Разовая доза. В пересчете на эсцин 100 мг В пересчете на эсцин	[5,11] [5]
6.	Agrimonia eupatoria L.	Репешок обыкнов.	трава	сухое сырье настой ж. экстракт настойка	3,0 г 40-80 мл 2-3 мл 1-3 мл		[11] [12] [12] [12]
7.	Agropyron repens	Пырей ползучий	корневище	сухое сырье ж. экстракт	6,0-9,0 г 4-8 мл	Разовая доза 1,0-4,0 г Разовая доза. Из расчета сырья 1:1	[4,11] [4]
8.	Alchemilla alpina L.	Манжетка альпийск.	трава	сухое сырье	НД		[11]
9.	Allium cepae	Лук репчатый	луковица	свеж. сырье сухое сырье	50 г 20 г		[2,11] [2,11]
10.	Allium sativum	Чеснок	плод	свеж. сырье сухое сырье сух. экстракт эфир. масло	2-5 г 400-1200 мг 300-1000 мг 2-5 мг	 В пересчете на аллиин 4-12 мг или аллицин 2-5 мг	[2,11] [2] [2] [2]
11.	Aloe vera	Алоэ настоящее	лист	сухой сок гель	40-110 мг 10-70%	В пересчете на гидроксиантрахиноны 10-30 мг	[2,11] [2]
12.	Alpina officinarum	Альпиния лекарств.	корневище	сухое сырье настойка	2,0-4,0 г 2,0-4,0 г		[11] [11]
13.	Althaea officinalis L.	Алтей лекарствен.	корень	свеж. сырье сироп ж. экстракт	0,5-6,0 г 2-10 мл 2-5 мл	Бронхиты – до 3 г; заб. ЖКТ – до 5 г Из расчета сырья 1:1	[5,11] [5,11] [14]

		 лист	настойка сухое сырье ж. экстракт	5-15 мл 5,0 г 2-5 мл	Из расчета сырья 1:5 Из расчета сырья 1:1	[14] [11] [14]
14.	Ananas comosus L.	Ананас крупнохохолков.	плоды	бромелайн	80-320 мг	В пересчете 200-800 ЕД FIP	[11]
15.	Andrographi paniculata		трава	свеж. сырье	1,5-9,0 г	При ОРВИ до 3 г, при диарее – до 9 г	[5]
16.	Anethum gravicolens L.	Укроп душистый	плоды	сухое сырье эфир. масло	3,0 г 0,1-0,3 г		[11] [11]
17.	Angelica sinensis	Дягель китайский	корень	свеж. сырье	4,9-9,0 г		[5]
18.	Archangelica officinalis	Дягель лекарствен.	корень лист	сухое сырье настой настойка ж. экстракт эфир. масло сухое сырье настойка	4,5 г 44,3-59,14 мл 1,5 г 1,5-3,0 г 0,5-1,0 мл 324-1944 мг 2-5 мл	Разовая доза 324-2000 мг Разовая доза. Из расчета сырья 1:16 Из расчета сырья 1:5 Из расчета сырья 1:1 Разовая доза Из расчета сырья 1:5	[1,3,11] [1] [11] [11] [11] [1] [14]
19.	Arctostaphylos uva-ursi L.	Толокнянка обыкнов.	лист	свеж. сырье ж. экстракт настойка	3,0 г 1,5-2,5 мл 2-4 мл	Разовая доза. В пересчете на гидрохино-новые производные (арбутин) 400-850 мг Из расчета сырья 1:1 Из расчета сырья 1:5	[5] [4] [4]
20.	Arnica montana L.	Арника горная	цветки	сухое сырье настойка полоскание мазь масло	2,0 г 1:3-10 1:10 20-25% 1:5	 В пересчете на масло 15%	[11] [11] [11] [11] [11]
21.	Artemisia absinthium	Полынь горькая	трава	сухое сырье ж. экстракт настойка	2,0-3,0 г 1-2 мл 0,25-1 мл	 Из расчета сырья 1:1 Из расчета сырья 1:5	[11] [15] [15]
22.	Asparagus officinalis L.	Спаржа аптечная	трава корень	 сухое сырье	НД 45,0-60,0 г		[11] [11]
23.	Astragalus membranaceus	Астрагал	корень	сухое сырье	9-30 г		[2]
24.	Atropa belladonna L.	Красавка обыкнов.	лист, корень	сухое сырье экстракт	50-100 мг 10 мг		[11] [11]
25.	Aurantium dulcis	Апельсин горький	околоплод.	сухое сырье	1944-3888 мг	Разовая доза	[1]
26.	Berberis aristata	Барбарис остистый	корень, ветви, плоды	настой настойка ж. экстракт	45-90 мл 5-10 мл 0,53-1,59 мл	Разовая доза. Из расчета сырья 1:20 Разовая доза. Из расчета сырья 1:10 Разовая доза. Из расчета сырья 1:8	[10] [10] [10]
27.	Berberis vulgaris	Барбарис обыкн.	плоды, ко-	сухое сырье	1,0-2,0 г		[11,13]

			ра, корень	ж. экстракт настойка	2-3 мл 2-4 мл	Из расчета сырья 1:1 Из расчета сырья 1:10	[13] [13]
28.	Betula pendula	Береза повислая	лист	сухое сырье	2,0-3,0 г		[11]
29.	Boerhaavia diffusa L.	Берхавия раскид.	трава, корень	сух. экстракт	3,888-15,552 г	Разовая доза	[10]
30.	Brucea javanica		плод	сухое сырье	3-16 г	При амебиазе 4-16 г/сут, малярии 3-6 г/сут	[2]
31.	Bupleurum falcatum L.	Володушка серповид.	корень	сухое сырье ж. экстракт	3-9 г 1,5-3 мл	 В неделю 25-60 мл	[2] [17]
32.	Calendula officinalis L.	Календула аптечн.	цветки	сухое сырье настойка мазь	1,0-2,0 г 1:3 2-5%	 Из расчета сырья в настойке 1:5	[11] [5] [5,11]
33.	Capparis aphylla	Каперсы безлистн.	корень, побег	настой	15-30 мл	Разовая доза. Из расчета сырья 1:10	[10]
34.	Capparis corundas L.		плод кора, лист	сироп сок отвар	5-10 мл 1,5-4,5 мл 30-60 мл	Разовая доза Разовая доза Разовая доза	[10] [10] [10]
35.	Capsella bursa-pastoris	Пастушья сумка	трава	настой настойка ж. экстракт	59,14-118,28 мл 3,7-7,4 мл 1,23-3,7 мл		[1] [1] [1]
36.	Carum carvi	Тмин обыкновен.	плод	сухое сырье настой эфир. масло	1,5-6,0 г 30-60 мл 0,025-0,3 мл	Разовая доза 648-3888 мг Разовая доза Разовая доза	[3,11] [3] [3,11]
37.	Caryophyllus aromaticus	Гвоздичное дерево	цветки	свеж. сырье ж. экстракт настойка	3,0-5,0 г 3-5 мл 10-25 мл	Разовая доза. Из расчета сырья 1:1 Из расчета сырья 1:5	[5] [5] [5]
38.	Cassia occidentalis L.	Кассия западная	семена лист корень цельное	сухое сырье отвар сухое сырье настой отвар	5,832 г 30-60 мл 5,832 г 15-30 мл 10-30 мл	Разовая доза Разовая доза Разовая доза Разовая доза Разовая доза	[10] [10] [10] [10] [10]
39.	Cassia senna L.	Сенна александрийск.	лист плоды	порошок сухое сырье	1-2 г 1-2 г	В пересчете на сеннозид В 10-30 мг В пересчете на сеннозид В 10-30 мг	[2] [2]
40.	Centaurium umbellatum	Золототысячник зонт.	трава	сухое сырье	6,0 г		[11]
41.	Centella asiatica	Готу кола	трава	сухое сырье настой	0,5-2,0 г 0,33-0,68 г	 Разовая доза	[13] [2]
42.	Cetraria islandica	Исландский мох	таллом	сухое сырье настойка	4,0-6,0 г 1-2 мл		[11] [14]
43.	Chelidonium majus L.	Чистотел большой	трава	сухое сырье	2,0-5,0 г	В пересчете на хелидонин 12-30 мг	[11]

				ж. экстракт настойка	1-2 мл 2-4 мл	Из расчета сырья 1:1 Из расчета сырья 1:10	[13] [13]
44.	Cichorium intubus L.	Цикорий обыкнов.	семена корни	отвар сухое сырье ж. экстракт	30-60 мл 3,0 г 30-60 мл	Разовая доза. Из расчета сырья 1:20	[10] [11] [10]
45.	Cimicifuga racemosa L.	Клопогон кистевид.	корневище	сух. экстракт	40 мг		[5,11]
46.	Cinchona pubescens	Хинное дерево	кора	сухое сырье ж. экстракт сух. экстракт	1,0-3,0 г 0,6-3,0 г 0,15-0,6 г	 Содержание общ. алкалоидов 4-5% Содержание общ. алкалоидов 15-20%	[11] [11] [11]
47.	Cinnamomum aromaticum		кора	свеж. сырье эфир. масло	2-4 г 0,05-0,2 г		[11] [11]
48.	Cinnamomum camphora L.	Камфорное дерево	камфора	сухое сырье мази, пасты спирт	30-300 мг 10-20% 1-10%	Для внутреннего применения	[11] [11] [11]
49.	Cinnamomum verum	Лавр настоящий	кора	свеж. сырье эфир. масло	2-4 г 0,05-0,2 г		[2,11] [2,11]
50.	Citrus ayrantium L.	Померанец	околоплод.	сухое сырье настойка экстракт	4,0-6,0 г 2,0-3,0 г 1,0-2,0 г		[11] [11] [11]
51.	Cnicus benedictus L.	Волчец благослов.	трава	сухое сырье	4,0-6,0 г		[11]
52.	Coffea arabica L.	Кофейное дерево	плоды	жжен. уголь	9,0 г		[11]
53.	Cola nitida	Кола настоящая	орехи	сухое сырье сух. экстракт ж. экстракт настойка напитки	2,0-6,0 г 0,25-0,75 г 2,5-7,5 г 10,0-30,0 г 60,0-180,0 г		[11] [11] [11] [11] [11]
54.	Colchicum automnale L.	Безвременник осенний	семена, цветки	сухое сырье	0,5-1,5 мг	В пересчете на колхицин	[11]
55.	Convallaria majalis L.	Ландыш майский	трава	порошок	0,6 г		[11]
56.	Coptis chinensis	Коптис китайский	корневище	свеж. сырье	1,5-6 г		[2]
57.	Coriandrum sativum	Кориандр посевн.	плод	сухое сырье настойка ж. экстракт	1296-2000 мг 10-15 мл 2-3 мл	 Из расчета сырья 1:5 Из расчета сырья 1:1	[1,9,11] [11] [11]
58.	Crataegus monogyna	Боярышник однопест.	цветки, лист	свеж. сырье сух. экстракт	1,0-1,5 г 160-900 мг	Разовая доза. Из расчета сырья 4-7:1. В пересчете на эпикатехин 30-168,75 мг; гиперозид 3,52-19,8 мг	[5] [5,11]
59.	Curcuma longa L.	Куркума длинная	корневище	свеж. сырье	3-9 г		[2]

				сухое сырье настой настойка ж. экстракт	1,5-3 г 0,5-1 г 0,5-1 мл 1,7-4,8 мл	В пересчете на куркумин 0,4-0,6 г Разовая доза. Из расчета сырья 1:10 Из расчета сырья 1:1	[2,11] [2] [2] [18]
60.	Curcuma xanthorrhiza	Куркума яванская	корневище	сухое сырье	2,0 г		[11]
61.	Cynara scolymus	Артишок колючий	лист	сухое сырье	6,0 г		[11]
62.	Drosera rotundifolia L.	Росянка круглолист.	трава	сухое сырье настойка настойка	3,0 г 1-2 мл 0,5-1 мл	 Из расчета сырья 1:1 Из расчета сырья 1:5	[11] [14] [15]
63.	Echinacea angustifolia	Эхинацея узколистн.	корень	сухое сырье экстракт настойка	1 г 0,5-1 мл 2-5 мл	 Разовая доза. Из расчета сырья 1:5 Разовая доза. Из расчета сырья 1:5	[2] [2] [2]
64.	Echinacea pallida	Эхинацея бледная	корень	сухое сырье	900 мг	Допускается пересчет на другие ЛФ	[2,11]
65.	Echinacea purpurea	Эхинацея пурпурн.	трава	сок мази, гели	6-9 мл 15%		[2,11] [2,11]
66.	Elettaria cardamomum L.	Кардамон настоящ.	плод	сухое сырье настойка	1,5 г 1,0-2,0 г		[11] [11]
67.	Eleutherococcus senticocus	Элеутерококк колюч.	корневище	свеж. сырье	2,0-3,0 г		[5,11]
68.	Ephedra sinica	Эфедра	трава	свеж. сырье ж. экстракт настойка	1-6 г 1-3 мл 6-8 мл	В пересчете на эфедрин 15-30 мг (у детей 0,5 мг/кг) Из расчета сырья 1:1 Из расчета сырья 1:4	[2,11] [2] [2]
69.	Equisetum arvense L.	Хвощ полевой	трава	сухое сырье ж. экстракт настойка компресс	6,0 г 1-4 мл 2-6 мл 10,0 г/л	 Из расчета сырья 1:1 Из расчета сырья 1:5	[11] [4] [4] [11]
70.	Eucaliptus globulus	Эвкалипт шариковый	лист	свеж. сырье настойка эфир. масло пастилки полоскания ингаляции мази, пасты гели	4,0-6,0 г 3,0-9,0 г 0,3-0,6 мл 0,2-15 мг 20 мл 0,6 мл 5-20% 5-10%	 Разовая доза Из расчета 0,091% раствора В пересчете на эфирное масло В пересчете на эфирное масло	[5,11] [11] [5] [5] [5] [5] [5] [5]
71.	Foeniculum vulgare	Фенхель обыкновен.	плоды	сухое сырье эфир. масло эликсир, сироп	5,0-7,0 г 0,1-0,6 мл 10-20 г	 Из расчета эфир. масла 500 мг/кг ЛФ	[7,11] [11] [7,11]

				настойка	5,0-7,5 г		[7,11]
72.	Fumaria officinalis L.	Дымянка лекарств.	трава	сухое сырье настойка	6,0 г 1-2 мл		[11] [13]
73.	Galeopsis segetum	Пикульник посевн.	трава	сухое сырье	6,0 г		[11]
74.	Gentiana lutea	Горечавка желтая	корень	сухое сырье настойка экстракт	2,0-4,0 г 1,0-3,0 г 2,0-4,0 г		[11] [11] [11]
75.	Ginkgo biloba L.	Гинкго двулопастн.	лист	сух. экстракт ж. экстракт	120-240 мг 0,5 мл	 Разовая доза	[2] [2]
76.	Glycyrrhiza glabra L.	Солодка голая	корень	свеж. сырье сух. экстракт	5-15 г 0,5-3,0 г	В пересчете на глицирризин 200-800 мг При бронхите 0,5-1,0 г, язвенной болезни желудка, 12-перстной кишки 1,5-3,0 г	[2] [11]
77.	Grindelia robusta	Гринделия мощная	трава	сухое сырье экстракт настойка	4,0-6,0 г 3,0-6,0 г 1,5-3,0 мл	 Из расчета сырья 1:5-10	[11] [11] [11]
78.	Guaiacum officinale L.	Гваяковое дерево	древесина	сухое сырье настойка	4,5 г 0,25-0,7 мл	 Из расчета сырья 1:10	[11] [16]
79.	Gypsophila paniculata L.	Гипсофила метельчат.	корень	сухое сырье	30-150 мг	В пересчете на сапонины 3-15 мг	[11]
80.	Hamamelis virginiana L.	Лещина виргинская	лист	свеж. сырье суппозитории ж. экстракт мази, гели растворы	5,0-10,0 г 0,1-1,0 г 2-4 мл 20-30% 5-10%	Разовая доза Разовая доза Из расчета сырья 1:1 Для наружного применения	[5] [5] [13] [5] [5]
81.	Harpagophytum procumbens	Мартиния душистая	корень	сухое сырье	1,5 г		[11]
82.	Harungana madagascariensis	Харонга мадагаск.	кора, лист	сух. экстракт	7,5-15 мг		[11]
83.	Hedera helix L.	Плющ обыкновен.	лист	сухое сырье	0,3 г		[11]
84.	Helichrysum arenarium L.	Бессмертник песчаный	цветки	сухое сырье	3,0 г		[11]
85.	Humulus lupulus	Хмель обыкновен.	соплодия	сухое сырье ж. экстракт	0,5 г 0,5-1,0 мл	Разовая доза Разовая доза. Из расчета сырья 1:1	[11] [4]
86.	Hypericum perforatum L.	Зверобой продырявл.	трава	свеж. сырье сух. экстракт настойка	2,0-4,0 г 900 мг 1-4 мл	В пересчете на общий гиперицин 0,2-2,7 мг	[5,11] [5,11] [14]
87.	Iberis amara	Иберис горький	трава	сухое сырье	64,8-324 мг		[1]
88.	Illicium verum	Бадьян обыкновен.	плоды	сухое сырье эфир. масло	3,0 г 300 мг		[11] [11]

89.	Juglaus regiae	Орех грецкий	лист	сухое сырье	2000-3000 мг		[11]
90.	Leonurus cardiaca L.	Пустырник сердечный	трава	сухое сырье настойка ж. экстракт	4,5 г 4-10 мл 2-4 мл	 Из расчета сырья 1:5 Из расчета сырья 1:1	[11] [4] [4]
91.	Lespedaza capitata	Леспедаза головч.	трава	настойка	0,84-1,2 мл	В пересчете на 15% раствор 5,6-8 мл	[6]
92.	Levislicum officinale	Любисток лекарствен.	корень	сухое сырье	4,0-8,0 г	Разовая доза	[11]
93.	Linum usitatissimum L.	Лен культурный	семя	сухое сырье компрессы	15,0-45,0 г 30,0-50,0 г	Разовая доза	[11] [11]
94.	Lycopus europaeus L.	Зюзник европейск.	трава	сухое сырье экстракт	1,0-2,0 г 20 мг		[11] [11]
95.	Marsdenia condurango	Кондуранго	кора	сухое сырье настойка ж. экстракт сух. экстракт	2,0-4,0 г 2,0-5,0 г 2,0-4,0 г 0,2-0,5 г		[11] [11] [11] [11]
96.	Matricaria chamomilla	Ромашка аптечная	цветки	сухое сырье ж. экстракт настой настойка экстракт мази, гели ингаляции	2-8 г 1-4 мл 3-10% 5% 1% 3-10% 6 г/л	Разовая доза Разовая доза. Из расчета сырья 1:1 Для полосканий, компрессов Для полосканий, компрессов Для полосканий, компрессов В пересчете на экстракт 0,8 г/л	[2,8] [2] [2,8,11] [2] [2] [2,8,11] [2]
97.	Melaleuca alternifolia		побеги, лист	эфир. масло	5-100%		[5]
98.	Melissa officinalis L.	Мелисса лекарств.	лист	свеж. сырье ж. экстракт настойка крем	1,5-4,5 г 2-4 мл 2-6 мл 1%	 Разовая доза. Из расчета сырья 1:1 Разовая доза. Из расчета сырья 1:5	[5,11] [5] [5] [5]
99.	Mentha piperita	Мята перечная	лист	свеж. сырье сухое сырье настойка ж. экстракт эфир. масло ингаляции пастилки масло, мази спирт. р-р мазь назальн.	1,0-6,0 г 1,5-3,0 г 2-3 мл 0,5-1,5 мл 0,2-0,4 мл 0,15-0,2 мл 2-10 мг 5-20% 5-10% 1-5%	Разовая доза Разовая доза Разовая доза. Из расчета сырья 1:5 Разовая доза. Из расчета сырья 1:2 Разовая доза Разовая доза. В пересчете на эфир. масло Разовая доза. В пересчете на эфир. масло	[5,11] [5] [5] [20] [5,11] [5,11] [5] [5,11] [5,11] [5,11]
100.	Menyanthes trifoliata L.	Трилистник водян.	лист	сухое сырье	1,5-3,0 г		[11]

101.	Nerium oleander L.	Олеандр обыкнов.	лист		НД		[11]
102.	Ocimum sanctum L.	Базилик священ.	лист	свеж. сырье	6,0-12,0 г		[5]
103.	Oenothera biennis L.	Примула вечерняя	побеги	масло	240-480 мг	В пересчете на γ-линоленовую кислоту. При экземе 320-480 мг, масталгии 240-320 мг	[5]
104.	Orthosiphon stamineus	Ортосифон тычиночн.	лист	сухое сырье	6,0-12,0 г		[11]
105.	Paeonia lactiflora	Пион молочноцвет.	корень	свеж. сырье	6-15 г	Стандартизирован по пионифлорину	[2]
106.	Panax ginseng	Жень-шень	корень	сухое сырье	0,5-2,0 г	Допускается пересчет на другие ЛФ	[2,11]
107.	Passiflora incarnata L.	Страстоцвет	трава	сухое сырье ж. экстракт	4,0-8,0 г 0,5-2 мл	 Из расчета сырья 1:1	[11] [4]
108.	Petroselinum crispum	Петрушка кудряв.	трава, корень	сухое сырье	6,0 г		[11]
109.	Peumus boldus	Больдо	лист	сухое сырье ж. экстракт настойка	3,0 г 0,1-0,3 мл 0,5-2 мл	 Из расчета сырья 1:1 Из расчета сырья 1:10	[11] [14] [14]
110.	Picea abies L.	Ель обыкновенная	хвоя	сухое сырье ванны	5,0-6,0 г 200-300 г		[11] [11]
111.	Pimpinella anisum L.	Анис обыкновен.	плоды	сухое сырье эфир. масло	3,0 г 0,3 г		[11]
112.	Pinus sylvestris L.	Сосна обыкновен.	хвоя	эфир. масло	10-50%	В виде мазей, гелей и проч.	[11]
113.	Piper methysticum	Перец опьяняющ.	корневище	свеж. сырье сух. экстракт	60-210 мг 60-210 мг	В пересчете на кава-пироны В пересчете на кава-пироны	[5,11] [5,11]
114.	Plantago lanceolata L.	Подорожник	трава	сухое сырье ж. экстракт	3,0-6,0 г 1-2 мл	 Из расчета сырья 1:2	[11] [20]
115.	Plantago ovata	Подорожник овальн.	семя	сухое сырье	4,0-20,0 г		[11]
116.	Plantago psyllium	Подорожник блошн.	семена	сухое сырье	7,5 г	Разовая доза	[2]
117.	Platycodon grandiflorum	Ширококолокольчик	корень	сухое сырье	2-9 г		[2]
118.	Polygala senega	Сенега американс.	корень	свеж. сырье ж. экстракт настойка	1,5-3,0 г 0,9-3,0 мл 2,5-7,5 г		[5,11] [5,11] [5,11]
119.	Polygonium aviculare L.	Горец птичий	трава	сухое сырье	4,0-6,0 г		[11]
120.	Populus tremula	Осина евразийск.	лист, кора	сухое сырье ж. экстракт ж. экстракт	60-130 мг 1-4 мл 1-2 мл	 Из расчета сырья 1:1 Из расчета сырья 1:2	[11] [17] [17]
121.	Primula veris L.	Первоцвет весен.	корень цветки	сухое сырье настойка сухое сырье	0,5-1,5 г 1,5-3,0 г 2,0-4,0 г		[11] [11] [11]

				настойка	2,5-7,5 г		[11]
122.	Prunus spinosa L.	Терн колючий	плоды цветки	сухое сырье сухое сырье	2,0-4,0 г НД		[11] [11]
123.	Pygeum africanum	Слива африканск.	кора	сух. экстракт	75-200 мг		[5]
124.	Quercus robur L.	Дуб обыкновенный	кора	сухое сырье полоскания ванны	3,0 г 20,0 г/л 5,0 г/л		[11] [11] [11]
125.	Raphanus sativus L.	Редька посевная	корень	сок	50-100 мл		[11]
126.	Rauvolfia serpentina L.	Раувольфия змеин.	корень	порошок	300-600 мг	В пересчете на общ. алкалоиды 6 мг	[2,11]
127.	Rhamnus frangula L.	Крушина ольховидн.	кора	свеж. сырье ж. экстракт	0,5-2,5 г 0,5-2,5 мл	В пересчете на глюкофрангулин А 20-30 мг	[5,11] [5]
128.	Rhamnus purshiana	Крушина американск.	кора	свеж. сырье настойка ж. экстракт	0,3-1,0 г 1-2 мл 1-2 мл	Разовая доза. В пересчете на каскарозид А 20-30 мг Из расчета сырья 1:2	[5,11] [20] [20]
129.	Rheum officinale	Ревень лекарств.	корневище	сухое сырье	0,5-1,5 г	В пересчете на гидроксиантраценовые компоненты 10-30 мг	[2,11]
130.	Rosmarinus officinalis	Розмарин аптечн.	лист	сухое сырье эфир. масло мази, гели, р-ры ванны	4,0-6,0 г 0,5-1,0 мл 6-10% 50,0 г	В пересчете на эфир. масло	[11] [11] [11] [11]
131.	Rubus fruticosus L.	Ежевика сизая	листья	сухое сырье	4,5 г		[11]
132.	Ruscus aculeatus L.	Иглица шиповатая	корневище	сух. экстракт	7-11 мг	В пересчете на общий рускогенин (неорускогенин+рускогенин)	[11]
133.	Salvia officinalis L.	Шалфей лекарств.	лист	сухое сырье эфир. масло настойка ж. экстракт полоскания	4,0-6,0 г 0,1-0,3 г 2,5-7,5 г 1,5-3,0 г 2,5 г	Листьев, что соответствует 0,1-0,15 мл эфир. масла или 5,0 г эктракта	[11] [11] [11] [11] [11]
134.	Sambucus nigra L.	Бузина черная	цветки	свеж. сырье ж. экстракт настойка	3,0-5,0 г 3-5 мл 10-25 мл	Разовая доза. До 10,0-15,0 г/сут Разовая доза Разовая доза. Из расчета сырья 1:5	[5,11] [5] [5]
135.	Serenoa repens	Сабаль мелкопильчат	плоды	свеж. сырье сух. экстракт настойка	1,0-2,0 г 160 мг 1-2 мл	Разовая доза. Стандартизирован по свободным жирным кислотам (70-95%)	[5] [5] [14]
136.	Silibum marianum	Расторопша пятнист.	плоды	свеж. сырье	12-15 г		[5,11]

				силимарин	200-400 мг	В пересчете на силибин	[5,11]
137.	Solidago virgaurea L.	Золотарник	трава	сухое сырье	6,0-12,0 г		[11]
138.	Symphytum officinale L.	Окопник лекарствен.	трава, лист, корень	мазь	5-20%	Не более 100 мкг пирролизидиновых алкалоидов в сутки, включая их N-оксиды.	[11]
139.	Syzygium aromaticum L.	Гвоздичное дерево	цветки	эфир. масло	1-5%	наружное	[11]
140.	Tanacetum parthenium		трава	свеж. сырье	0,2-0,6 мг	В пересчете на партенолиды	
141.	Taraxacum officinale	Одуванчик лекарств.	трава	сухое сырье	4,0-10,0 г	Разовая доза	[11]
				ж. экстракт	4-10 мл	Разовая доза. Из расчета сырья 1:1	[11]
				настойка	2-5 мл	Из расчета сырья 1:5	[17]
				сок	5-10 мл	Разовая доза	[17]
			корень	сухое сырье	3,0-4,0 г	Разовая доза	[11]
				настойка	0,5-0,75 мл	Разовая доза	[11]
				ж. экстракт	1-2 мл	Из расчета сырья 1:2	[17]
				сок	4-8 мл	Разовая доза	[17]
142.	Terminalia chebula	Миробалан. дерево	плод	сухое сырье	2000-3888 мг		[1]
143.	Thymus serpyllum L.	Чабрец	трава	сухое сырье	6,0 г		[11]
144.	Thymus vulgaris L.	Тимьян обыкновен.	трава	сухое сырье	1-2 г		[2]
				настойка	2 мл	Разовая доза. Из расчета сырья 1:10	[2]
				ж. экстракт	1,0-2,0 г	Разовая доза	[11]
				полоскания	5%		[2,11]
145.	Tilia cordata	Липа мелколистн.	древесина	уголь	НД	Для наружного применения, клизм	[11]
				сухой сок	НД	Как желчегонное, при целлюлите	[11]
			цветки	сухое сырье	2,0-4,0 г		[11]
			лист	сухое сырье	НД	Как диафоретическое	[11]
146.	Tilia platyphyllos	Липа крупнолистн.	цветки	ж. экстракт	2-4 мл	Из расчета сырья 1:10	[4]
				настойка	4-10 мл	Из расчета сырья 1:5	[4]
147.	Tilia tomentosa	Липа войлочная	цветки	сухое сырье	НД	Как отхаркивающее, диафоретическое, диуретическое	[11]
148.	Trigonella foenum-graecum	Пажитник греческ.	семя	сухое сырье	6,0 г	Разовая доза. Для наружного применения 50 г/л воды	[11]
149.	Tussilago farfara L.	Мать-и-мачеха обыкн.	лист	сухое сырье	4,5-6,0 г	Не более 10 мкг пирролизидиновых алкалоидов в сутки, включая их N-оксиды.	[11]
150.	Urginea maritima L.	Морской лук	луковицы	порошок	0,1-0,5 г		[11]
151.	Urtica dioica L.	Крапива двудомная	корень	свеж. сырье	4,0-6,0 г		[5,11]
				сух. экстракт	600-1200 мг	Из расчета сырья 5:1	[5]
				ж. экстракт	1,5-7,5 мл	Из расчета сырья 1:1	[5]

			лист	сухое сырье ж. экстракт настойка	8,0-12,0 г 3-4 мл 2-6 мл	 Из расчета сырья 1:1 Из расчета сырья 1:5	[11] [20] [20]
152.	Vaccinium myrtillus L	Черника миртолистн.	плоды	сухое сырье отвар	20,0-60,0 г 10%	 Наружное	[11] [11]
153.	Valeriana officinalis L.	Валериана лекарств.	корень	сухое сырье настойка сух. экстракт	2,0-3,0 г 1-3 мл 2,0-3,0 г	Разовая доза Разовая доза. Из расчета сырья 1:5 Разовая доза	[2,11] [2,11] [11]
154.	Viola tricolor L.	Фиалка трехцветн.	трава	сухое сырье	1,5 г	Разовая доза	[11]
155.	Vitex agnus castus L.	Витекс священ.	плоды	ж. экстракт	30-40 мг		[11]
156.	Xysmalobium undulatum	Узара волнистая	корень	сухое сырье	1,0 г	Разовая доза или 75 мг общих гликозидов. В пересчете на узарин 45-90 мг/сут	[11]
157.	Zingiber officinalis	Имбирь лекарств.	корневище	сухое сырье	1,0-4,0 г	При кинетозах 0,5 г; диспепсии 2-4 г	[2,11]

ТАБЛИЦА 2. ПЕРЕЧЕНЬ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ (ЛЕЧЕБНЫХ) ДОЗ ФИКСИРОВАННЫХ КОМБИНАЦИЙ ФИТОПРЕПАРАТОВ [11]

№	ЛАТИНСКОЕ НАЗВАНИЕ	РУССКОЕ НАЗВАНИЕ	ЧАСТЬ	ВЕЛИЧИНА DDD ОТ ДОЗЫ МОНОКОМПОНЕНТНОГО СРЕДСТВА
1.	Adonis vernalis L. Convallaria majalis L. Nerium oleander L. Urginea maritima L.	Адонис весенний Ландыш майский Олеандр обыкнов. Urginea maritima L.	ж. экстракт сух. экстракт сух. экстракт сух. экстракт	270-540 GPU суммарно
2.	Archangelica officinalis Artemisia absinthium Gentiana lutea Mentha piperita	Дягель лекарствен. Полынь горькая Горечавка желтая Мята перечная	корень трава корень эфир. масло	30-50% 30-50% 30-50% 100%
3.	Archangelica officinalis Gentiana lutea Citrus ayrantium L.	Дягель лекарствен. Горечавка желтая Померанец	корень корень околоплод.	30-50% 30-50% 30-50%
4.	Archangelica officinalis Gentiana lutea Carum carvi	Дягель лекарствен. Горечавка желтая Тмин обыкновен.	корень корень плод	50-75% 50-75% 100%
5.	Archangelica officinalis Gentiana lutea Foeniculum vulgare	Дягель лекарствен. Горечавка желтая Фенхель обыкновен.	корень корень плод	50-75% 50-75% 100%
6.	Archangelica officinalis Artemisia absinthium Gentiana lutea	Дягель лекарствен. Полынь горькая Горечавка желтая	корень трава корень	30-50% 30-50% 30-50%
7.	Arctostaphylos uva-ursi L. Solidago virgaurea L. Orthosiphon stamineus	Толокнянка обыкнов. Золотарник Ортосифон тычиночн.	лист трава лист	100% 30-50% 30-50%
8.	Betula pendula Solidago virgaurea L. Orthosiphon stamineus	Береза повислая Золотарник Ортосифон тычиночн.	лист трава лист	30-50% 30-50% 30-50%
9.	Cassia senna L. Plantago ovata	Сенна александрийск Подорожник овальн.	лист семя	50-75% 50-75%
10.	Cassia senna L. Mentha piperita Carum carvi	Сенна александрийск Мята перечная Тмин обыкновен.	лист эфир. масло эфир. масло	100% 50-75% 50-75%
11.	Cinnamomum camphora L. Eucaliptus globules Pinus sylvestris L.	Камфорное дерево Эвкалипт шариковый Сосна обыкновен.	камфора эфир. масло эфир. масло	30-50% 30-50% 30-50%
12.	Curcuma longa L. Chelidonium maijus L.	Куркума длинная Чистотел большой	корневище трава	100% 100%
13.	Curcuma xanthorrhiza Chelidonium maijus L. Artemisia absinthium	Куркума яванская Чистотел большой Полынь горькая	корневище трава трава	30-50% 100% 30-50%
14.	Curcuma xanthorrhiza Mentha piperita Artemisia absinthium	Куркума яванская Мята перечная Полынь горькая	корневище лист трава	30-50% 30-50% 30-50%
15.	Drosera rotundifolia L. Thymus vulgaris L.	Росянка круглолист. Тимьян обыкновен.	трава трава	50-75% 50-75%
16.	Eucaliptus globules Pinus sylvestris L.	Эвкалипт шариковый Сосна обыкновен.	эфир. масло эфир. масло	50% или 3-10% в мази 50% или 3-10% в мази
17.	Eucaliptus globules Primula veris L. Thymus vulgaris L.	Эвкалипт шариковый Первоцвет весен. Тимьян обыкновен.	эфир. масло корень трава	30-50% 30-50% 30-50%

18.	Foeniculum vulgare Carum carvi	Фенхель обыкновен. Тмин обыкновен.	плоды плоды	50-75% 50-75%
19.	Foeniculum vulgare Carum carvi	Фенхель обыкновен. Тмин обыкновен.	эфир. масло эфир. масло	50-75% 50-75%
20.	Foeniculum vulgare Carum carvi Matricaria chamomilla	Фенхель обыкновен. Тмин обыкновен. Ромашка аптечная	плоды плоды цветки	30-50% 30-50% 30-50%
21.	Foeniculum vulgare Carum carvi Matricaria chamomilla	Фенхель обыкновен. Тмин обыкновен. Ромашка аптечная	эфир. масло эфир. масло цветки	30-50% 30-50% 30-50%
22.	Foeniculum vulgare Althaea officinalis L. Cetraria islandica Thymus vulgaris L.	Фенхель обыкновен. Алтей лекарствен. Исландский мох Тимьян обыкновен.	плоды корень таллом трава	50-75% 50-75% 50-75% 50-75%
23.	Glycyrrhiza glabra L. Hedera helix L. Thymus vulgaris L.	Солодка голая Плющ обыкновен. Тимьян обыкновен.	корень лист трава	30-50% 30-50% 30-50%
24.	Glycyrrhiza glabra L. Matricaria chamomilla	Солодка голая Ромашка аптечная	корень цветки	50-75% 50-75%
25.	Glycyrrhiza glabra L. Mentha piperita Matricaria chamomilla	Солодка голая Мята перечная Ромашка аптечная	корень лист цветки	50-75% 50-75% 50-75%
26.	Grindelia robusta Primula veris L. Thymus vulgaris L.	Гринделия мощная Первоцвет весен. Тимьян обыкновен.	трава корень трава	30-50% 30-50% 30-50%
27.	Humulus lupulus Melissa officinalis L.	Хмель обыкновен. Мелисса лекарств.	соплодия лист	50-75% 50-75%
28.	Humulus lupulus Passiflora incarnate L.	Хмель обыкновен. Страстоцвет	соплодия трава	50-75% 50-75%
29.	Illicium verum Thymus vulgaris L.	Бадьян обыкновен. Тимьян обыкновен.	плоды трава	50-75% 50-75%
30.	Mentha piperita Carum carvi	Мята перечная Тмин обыкновен.	лист плоды	50-75% 50-75%
31.	Mentha piperita Carum carvi Matricaria chamomilla	Мята перечная Тмин обыкновен. Ромашка аптечная	лист плоды цветки	30-50% 30-50% 30-50%
32.	Mentha piperita Foeniculum vulgare	Мята перечная Фенхель обыкновен.	лист плоды	50-75% 50-75%
33.	Mentha piperita Carum carvi Foeniculum vulgare	Мята перечная Тмин обыкновен. Фенхель обыкновен.	лист плоды плоды	30-50% 30-50% 30-50%
34.	Mentha piperita Carum carvi Matricaria chamomilla Citrus ayrantium L.	Мята перечная Тмин обыкновен. Ромашка аптечная Померанец	лист плоды цветки околоплод.	25-40% 25-40% 25-40% 25-40%
35.	Mentha piperita Carum carvi Foeniculum vulgare Matricaria chamomilla	Мята перечная Тмин обыкновен. Фенхель обыкновен. Ромашка аптечная	лист плоды плоды цветки	20-40% 20-40% 20-40% 20-40%
36.	Mentha piperita Foeniculum vulgare Matricaria chamomilla	Мята перечная Фенхель обыкновен. Ромашка аптечная	лист плоды цветки	30-50% 30-50% 30-50%
37.	Mentha piperita Carum carvi	Мята перечная Тмин обыкновен.	эфир. масло эфир. масло	50-75% 50-75%
38.	Mentha piperita	Мята перечная	эфир. масло	50-75%

	Foeniculum vulgare	Фенхель обыкновен.	эфир. масло	50-75%
39.	Mentha piperita Carum carvi Foeniculum vulgare Matricaria chamomilla	Мята перечная Тмин обыкновен. Фенхель обыкновен. Ромашка аптечная	эфир. масло эфир. масло эфир. масло цветки	25-40% 25-40% 25-40% 25-40%
40.	Mentha piperita Carum carvi Matricaria chamomilla	Мята перечная Тмин обыкновен. Ромашка аптечная	эфир. масло эфир. масло цветки	30-50% 30-50% 30-50%
41.	Mentha piperita Carum carvi Foeniculum vulgare	Мята перечная Тмин обыкновен. Фенхель обыкновен.	эфир. масло эфир. масло эфир. масло	30-50% 30-50% 30-50%
42.	Mentha piperita Foeniculum vulgare Matricaria chamomilla	Мята перечная Фенхель обыкновен. Ромашка аптечная	эфир. масло эфир. масло цветки	30-50% 30-50% 30-50%
43.	Passiflora incarnate L. Valeriana officinalis L. Melissa officinalis L.	Страстоцвет Валериана лекарств. Мелисса лекарств.	трава корень лист	30-50% 30-50% 30-50%
44.	Pimpinella anisum L. Cetraria islandica	Анис обыкновен. Исландский мох	эфир. масло таллом	100% 100%
45.	Pimpinella anisum L. Foeniculum vulgare Glycyrrhiza glabra L. Thymus vulgaris L.	Анис обыкновен. Фенхель обыкновен. Солодка голая Тимьян обыкновен.	эфир. масло эфир. масло корень трава	25-40% 25-40% 25-40% 25-40%
46.	Pimpinella anisum L. Foeniculum vulgare Carum carvi	Анис обыкновен. Фенхель обыкновен. Тмин обыкновен.	эфир. масло эфир. масло эфир. масло	30-50% 30-50% 30-50%
47.	Pimpinella anisum L. Primula veris L. Thymus vulgaris L.	Анис обыкновен. Первоцвет весен. Тимьян обыкновен.	эфир. масло корень трава	30-50% 30-50% 30-50%
48.	Pimpinella anisum L. Foeniculum vulgare Carum carvi	Анис обыкновен. Фенхель обыкновен. Тмин обыкновен.	плоды плоды плоды	30-55% 30-55% 30-55%
49.	Pimpinella anisum L. Tilia cordata Thymus vulgaris L.	Анис обыкновен. Липа мелколистн. Тимьян обыкновен.	плоды цветки трава	50-75% 100% 50-75%
50.	Pimpinella anisum L. Althaea officinalis L. Eucaliptus globules Glycyrrhiza glabra L.	Анис обыкновен. Алтей лекарствен. Эвкалипт шариковый Солодка голая	плоды корень эфир. масло корень	30-50% 100% 30-50% 30-50%
51.	Pimpinella anisum L. Althaea officinalis L. Cetraria islandica Glycyrrhiza glabra L.	Анис обыкновен. Алтей лекарствен. Исландский мох Солодка голая	плоды корень таллом корень	50-75% 50-75% 50-75% 50-75%
52.	Pimpinella anisum L. Althaea officinalis L. Primula veris L. Drosera rotundifolia L.	Анис обыкновен. Алтей лекарствен. Первоцвет весен. Росянка круглолист.	плоды корень корень трава	50-75% 100% 50-75% 100%
53.	Pimpinella anisum L. Althaea officinalis L. Primula veris L. Glycyrrhiza glabra L.	Анис обыкновен. Алтей лекарствен. Первоцвет весен. Солодка голая	плоды корень корень корень	30-50% 100% 30-50% 30-50%
54.	Primula veris L. Foeniculum vulgare Glycyrrhiza glabra L. Hedera helix L.	Первоцвет весен. Фенхель обыкновен. Солодка голая Плющ обыкновен.	корень плоды корень лист	25-40% 25-40% 25-40% 25-40%

55.	Primula veris L. Thymus vulgaris L.	Первоцвет весен. Тимьян обыкновен.	корень трава	50-75% 50-75%
56.	Primula veris L. Thymus vulgaris L. Drosera rotundifolia L.	Первоцвет весен. Тимьян обыкновен. Росянка круглолист.	корень трава трава	50-75% 50-75% 50-75%
57.	Primula veris L. Althaea officinalis L. Pimpinella anisum L.	Первоцвет весен. Алтей лекарствен. Анис обыкновен.	корень корень плоды	50-75% 100% 50-75%
58.	Silibum marianum Mentha piperita Artemisia absinthium	Расторопша пятнист. Мята перечная Полынь горькая	плоды лист трава	30-50% 30-50% 30-50%
59.	Taraxacum officinale Chelidonium maijus L. Cynara scolymus	Одуванчик лекарств. Чистотел большой Артишок колючий	трава, корень трава лист	50-75% 100% 50-75%
60.	Taraxacum officinale Chelidonium maijus L. Artemisia absinthium	Одуванчик лекарств. Чистотел большой Полынь горькая	трава, корень трава трава	50-75% 100% 50-75%
61.	Taraxacum officinale Mentha piperita Cynara scolymus	Одуванчик лекарств. Мята перечная Артишок колючий	трава, корень лист лист	50-75% 100% 50-75%
62.	Thymus vulgaris L. Althaea officinalis L. Primula veris L. Glycyrrhiza glabra L.	Тимьян обыкновен. Алтей лекарствен. Первоцвет весен. Солодка голая	трава корень корень корень	30-50% 100% 30-50% 30-50%
63.	Thymus vulgaris L. Gypsophila paniculata L.	Тимьян обыкновен. Гипсофила метельчат.	трава корень	50-75% 50-75%
64.	Valeriana officinalis L. Humulus lupulus	Валериана лекарств. Хмель обыкновен.	корень соплодия	50-75% 50-75%
65.	Valeriana officinalis L. Melissa officinalis L.	Валериана лекарств. Мелисса лекарств.	корень лист	50-75% 50-75%
66.	Valeriana officinalis L. Humulus lupulus Melissa officinalis L.	Валериана лекарств. Хмель обыкновен. Мелисса лекарств.	корень соплодия лист	30-50% 30-50% 30-50%
67.	Valeriana officinalis L. Humulus lupulus Passiflora incarnate L.	Валериана лекарств. Хмель обыкновен. Страстоцвет	корень соплодия трава	30-50% 30-50% 30-50%
68.	Valeriana officinalis L. Passiflora incarnate L.	Валериана лекарств. Страстоцвет	корень трава	50-75% 50-75%
69.	Zingiber officinalis Gentiana lutea Artemisia absinthium	Имбирь лекарств. Горечавка желтая Полынь горькая	корневище корень трава	30-50% 30-50% 30-50%

ОСНОВНАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. King,s American Dispensatory. – 1898.
2. WHO monographs on selected medicinal plants. – Vol. 1. – WHO, Geneva, 1999.
3. British Pharmaceutical Codex. – Council Pharm. Soc., Great Britain. – 1911.
4. British Herbal Compendium. – Vol. 1. – 1992.
5. WHO monographs on selected medicinal plants. – Vol. 2. – WHO, Geneva, 1999.
6. EMEA/MRL/419/98-FINAL. – The European Agency for the Evaluation of Medical Products. – June, 1998.
7. U.S. Federal Registry № 74. – Apr. 19, 1991.
8. U.S. Federal Registry № 50. – March 13, 1990.
9. U.S. Federal Registry № 173. – Sept. 18, 1986.
10. The Indian Materia Medica.
11. German Commission E Monographs
12. Motram L. Herbal Materia Medica Course Notes. – 1983.
13. Mills S. The Complete Guide to Modern Herbalism. – Thorsons, Great Britain. – 1994.
14. Hoffmann D. The New Holistic Herbal. – Dorset. – 1990.
15. British Herbal Pharmacopoeia, 1983. – British Herbal Medical Association. – 1989.
16. Koeman M. Materia Medica Class Notes. – Nature Care College. – 1998.
17. Salmond Ses Materia Medica Class Notes. – Nature Care College. – 1997.
18. Murray M. The Healing Power of Herbs. – USA< Prima Publishing. – 1995.
19. Thomsen M. Phytoterapy Desk Reference, 2nd ed. – Australia. – 2001.
20. Herbal Medicine. Materia Medica. – Australian Naturopathic Network. – 2002.

6. ОБЩИЕ СТАТЬИ НА ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ФОРМЫ И СУБСТАНЦИИ

ОСНОВНЫЕ ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Настоящий раздел содержит определения и/или объяснения терминов, которые встречаются в тексте или используются в общих статьях на лекарственные формы, но не дают их определения. При необходимости дается ссылка на другие равнозначные термины, которые используются в других публикациях или контекстах. Данный раздел предназначен для справки.

Активное вещество

Синонимы: активный ингредиент, действующее вещество, лекарственное вещество, активный фармакологический ингредиент.

Носитель

Носитель - одно или более вспомогательных веществ, которые доставляют активное вещество/вещества в жидком лекарственном средстве.

Основа

Основа - одно или более вспомогательных веществ, которые доставляют активное вещество/вещества в мягком и твёрдом лекарственных средствах.

Дозированные формы со стандартным высвобождением

Дозированные формы со стандартным высвобождением - лекарственные средства с высвобождением активного вещества/веществ, которое не меняется преднамеренно в зависимости от состава, формулы и/или способа производства лекарственного средства. Для твёрдого лекарственного средства характеристики растворения активного вещества зависят, главным образом, от его внутренних свойств. Синоним: дозированная форма с моментальным высвобождением.

Дозированные формы с модифицированным высвобождением

Дозированные формы с модифицированным высвобождением - лекарственные средства, у которых скорость и/или место высвобождения активного вещества/веществ отличаются от скорости высвобождения в дозированных формах со стандартным высвобождением, назначаемых тем же способом. Такое преднамеренное изменение достигается при помощи специально разработанной формулы и/или способа производства лекарственного средства. Дозированные формы с модифицированным высвобождением включают дозированные формы с пролонгированным действием, замедленным действием и прерывистым действием.

Дозированные формы с пролонгированным действием

Дозированные формы с пролонгированным действием – лекарственные средства с модифицированным высвобождением с более медленным высвобождением активного вещества/веществ по сравнению с дозированными формами со стандартным высвобождением, назначаемыми тем же способом. Пролонгированное действие достигается при помощи специально разработанной формулы и/или способа производства лекарственного средства. Синонимы: дозированные формы с длительным действием.

Дозированные формы с замедленным действием

Дозированные формы с замедленным действием – лекарственные средства с модифицированным высвобождением, в которых высвобождение активного вещества/веществ происходит более медленно. Замедленное высвобождение достигается при помощи специально разработанной формулы и/или способа производства лекарственного средства. К дозированным формам с замедленным действием относятся кишечно-растворимые лекарственные средства, указанные в общих статьях на твёрдые дозированные лекарственные формы.

Дозированные формы с прерывистым действием

Дозированные формы с прерывистым действием – лекарственные средства с модифицированным высвобождением с последовательным высвобождением активного вещества/веществ. Последовательное высвобождение достигается при помощи специально разработанной формулы и/или способа производства лекарственного средства.

Парентеральные лекарственные средства большого объёма

Инфузии и инъекции, выпускаемые в контейнерах с номинальным объёмом более 100 мл.

Парентеральные лекарственные средства малого объёма

Инфузии и инъекции, выпускаемые в контейнерах с номинальным объёмом менее 100 мл.

ВАКЦИНЫ ДЛЯ МЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

При отсутствии частной статьи для комбинированных вакцин, вакцины должны соответствовать требованиям частных статей для каждого конкретного компонента, с соответствующими модификациями, утвержденными компетентными органами.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Вакцины для медицинского применения – это лекарственные средства, содержащие антигенные вещества, способные индуцировать специфический и активный иммунитет у человека против возбудителя инфекции, или токсина, или антигена, вырабатываемого возбудителем.

Вакцины для медицинского применения могут содержать: инактивированные химическими или физическими способами организмы, сохранившие иммуногенные свойства; невирулентные или специально обработанные для уменьшения их вирулентности живые организмы, сохранившие иммуногенные свойства; антигены, экстрагированные или секретированные из организмов, или же произведенные посредством технологии рекомбинантной ДНК; антигены могут использоваться в природном виде, могут детоксифицироваться химическими или физическими средствами, могут соединяться, полимеризироваться или объединяться для увеличения их иммуногенности.

Терминология, используемая в частных статьях для вакцин для медицинского применения, определяется в разделе 5.2.1.

Бактериальные вакцины представляют собой или лиофилизат, или различной степени мутные суспензии в бесцветных или почти бесцветных жидкостях. Концентрация живых или инактивированных бактерий выражается в

Международных Единицах Мутности или, где это приемлемо, определяется посредством прямого подсчета клеток или же, для живых бактерий, определением количества жизнеспособных микроорганизмов.

Бактериальные анатоксины готовятся из токсинов посредством уменьшения их токсичности ниже определяемого уровня или, посредством полного устранения токсичности физическими или химическими методами, с сохранением иммуногенных свойств. Токсины получаются из соответствующих штаммов микроорганизмов. При производстве анатоксин не должен превращаться в токсин. Анатоксины могут быть жидкими или высушенными вымораживанием (лиофилизат), очищенными и адсорбированными. Адсорбированные анатоксины представляют собой взвесь белых или серых частиц в бесцветных или бледно-желтых жидкостях. На дне контейнера может образовываться осадок.

Вирусные вакцины готовятся из вирусов, выращенных в организме животных, на куриных эмбрионах, в подходящих тканях, в соответствующих клеточных культурах. Они являются жидкостями, разной степени мутности или могут быть высушены вымораживанием. После приготовления они могут окрашиваться, если в питательной среде используется индикатор, типа феноловый красный.

ПРОИЗВОДСТВО

Общие положения. Требования к производству, включающие испытания в ходе производства, указываются в частных статьях.

Как правило, вакцины производятся с использованием эталонного банка культур микроорганизмов. Методы приготовления должны обеспечивать соответствующие иммуногенные свойства, обезвреживание и предотвращение загрязнения лекарственного средства посторонними агентами.

Как правило, при производстве конечной партии вакцины, число пассажей вируса или бактерий из контрольного банка культур микроорганизмов не должно превышать то, которое использовалось для производства вакцины, представленной для клинических испытаний.

Вакцины, по возможности, не должны содержать токсичные и аллергенные ингредиенты. В состав вакцин могут входить необходимые добавки, включая стабилизаторы и адъюванты. Пенициллин и стрептомицин не используются при производстве и не добавляются в конечный продукт; однако, может использоваться контрольный банк микроорганизмов, приготовленный на среде, содержащей пенициллин или стрептомицин, если это оправдано и разрешено.

Субстраты для размножения. Субстраты для размножения должны выдерживать соответствующие требования Фармакопеи (5.2.2, 5.2.3) или, в отсутствии таких требований, предписания уполномоченных органов. Подготовка банков клеток и последующих клеточных культур осуществляется в асептических условиях, в помещении, где не ведутся работы с другими клеточными культурами. Сыворотка и трипсин, используемые в приготовлении клеточных суспензий не должны содержать посторонних агентов.

Банки культур микроорганизмов. Штаммы бактерий или вирусов, используемые в контрольном банке микроорганизмов, идентифицируются посредством архивных записей, которые включают информацию о происхождении штамма и о последующих манипуляциях с ним. Необходимо предпринять меры,

чтобы гарантировать, что никакой другой микроорганизм кроме исходного стандартного штамма не присутствует в банке культур микроорганизмов.

Питательная среда. Питательная среда, по возможности, не должна содержать токсичные и аллергенные ингредиенты. Если включение таких компонентов необходимо, то нужно убедиться, что их количество в конечном продукте на выходе безопасно. Сыворотка животного (но не человеческого) происхождения может использоваться в питательной среде для поддержания роста клеточных культур. Однако, во время накопления вирусов среда не должна содержать такую сыворотку, если не утверждены другие требования. Питательные среды могут содержать индикатор pH, например, феноловый красный и разрешенные антибиотики в самой низкой эффективной концентрации, хотя предпочтительно иметь среду не содержащую антибиотиков.

Размножение и сбор. Исходные стандартные культуры размножаются и собираются при определенных условиях. Чистота сбора проверяется посредством проведения испытаний, указанных в частной статье.

Контрольные культуры клеток. Контрольные клетки для вакцин, производимых на клеточной культуре, должны содержаться в таких же условиях, в которых осуществляется производство клеточной культуры, включая использование той же самой партии питательной среды.

Контрольные куриные эмбрионы. Контрольные куриные эмбрионы для живых вакцин, производимых в куриных эмбрионах, инкубируются и проверяются, как указывается в частной статье.

Очистка. Могут применяться только утвержденные процедуры очистки.

Инактивация. Инактивированные вакцины производятся в ходе эффективного валидированного процесса инактивации. В случае обнаружения остаточной инфекционности, проводится процесс дополнительной инактивации. Испытание на эффективность инактивации выполняется, по возможности, сразу же после процесса инактивации.

Промежуточные продукты. Оцениваться стабильность промежуточных продуктов при данных условиях хранения, устанавливаться их срок годности.

Конечный не фасованный продукт. Конечный не фасованный продукт готовится путем смешивания компонентов вакцины в асептических условиях.

Адсорбенты. Вакцины могут адсорбироваться на гидроокиси алюминия, на фосфате алюминия, фосфате кальция или другом подходящем адсорбенте.

Антимикробные консерванты. Стерильные и инактивированные вакцины могут содержать соответствующие антимикробные консерванты. Они обязательно добавляются, если продукт выпускается в многодозовых контейнерах, если не указано иначе. Антимикробный консервант не должен влиять на безопасность и эффективность вакцины.

На стадии разработки должна быть доказана эффективность антимикробного консерванта в течение срока годности вакцины.

Эффективность антимикробного консерванта оценивается согласно разделу 5.1.3. Если не могут быть выполнены ни критерий А, ни критерий В, то для оценки эффективности антимикробного консерванта используются следующие критерии:

– бактерии: 24 часа и 7 дней – нет увеличения, 14 дней – lg уменьшения 3, 28 дней – нет увеличения;

– грибы: 14 дней и 28 дней – нет увеличения.

Конечный продукт. Для вакцин парентерального применения, конечный продукт готовится путем асептического распределения конечного не фасованного продукта в стерильные плотно закупоривающиеся контейнеры. Контейнеры закрывают таким образом, чтобы исключить контаминацию. Для вакцин не парентерального применения конечный продукт готовится путем распределения конечного не фасованного продукта в соответствующих условиях в стерильные плотно закупоривающиеся контейнеры.

Стабильность. Сохранность активности конечного продукта в течение срока годности должна оцениваться валидационными исследованиями; при чрезмерном снижении активности, даже в допустимых пределах, вакцина признается не пригодной.

Степень адсорбции. Во время разработки адсорбированной вакцины, степень адсорбции оценивается, как часть исследования на стабильность. Определение требований по степени адсорбции устанавливается, исходя из результатов, найденных для серии, прошедшей клинические испытания. Из данных изучения стабильности вакцины, должно быть видно, что в конце срока годности степень адсорбции не ниже, чем степень адсорбции серии, использованной в клинических испытаниях.

ИСПЫТАНИЯ

Вакцины должны отвечать требованиям, описанным в частных статьях, включающим, где это применимо, следующие:

Алюминий (2.5.13). Если использовался адсорбент алюминия, то допускается не более 1,25 мг алюминия в одной дозе для человека, если не предписано иначе.

Кальций (2.5.14). Если использовался адсорбент кальция – не более 1,3 мг кальция в одной дозе для человека, если не предписано иначе.

Формальдегид (2.4.18). Если в приготовлении вакцины использовался формальдегид, то допускается не более 0,2 г/л свободного формальдегида в конечном продукте, если не предписано иначе.

Фенол (2.5.15). Если в приготовлении вакцины использовался фенол, то допускается не более 2,5 г/л фенола в конечном продукте, если не предписано иначе.

Вода (2.5.12). Для высушенных вымораживанием вакцин, допускается не более 3,0 % м/м, если не предписано иначе.

ХРАНЕНИЕ

Хранят в защищенном от света месте. Если не предписано иначе, температура хранения 5 ± 3 °C; адсорбированные жидкие вакцины нельзя подвергать замораживанию.

Срок годности. Если не предписано иначе, срок годности рассчитывается с момента начала испытаний.

МАРКИРОВКА

На этикетке указывается:

– наименование лекарственного средства,

– контрольный номер, идентифицирующий конечный продукт,

– рекомендуемая дозировка для человека и порядок приема,

– условия хранения,

– срок хранения,

– наименование и количество антимикробного консерванта,

– наименование антибиотика, ароматизатора, стабилизатора и других вспомогательных веществ, содержащихся в вакцине,

– наименование любого элемента, который может вызвать неблагоприятные реакции и любые противопоказания к использованию вакцины,

– для высушенных вымораживанием вакцин:

  – название или состав и объем жидкости для приготовления,

  – время, в пределах которого вакцина должна использоваться после приготовления.

ГЛАЗНЫЕ ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Глазные лекарственные средства - стерильные жидкие, мягкие или твердые лекарственные средства, предназначенные для нанесения на глазное яблоко и/или конъюнктиву или для введения в конъюнктивальный мешок.

Контейнеры для глазных лекарственных средств должны соответствовать требованиям статей *«Материалы, используемые для производства контейнеров» (3.1 и подразделы) «Контейнеры» (3.2 и подразделы),* если нет других указаний в частной статье.

Глазные лекарственные средства можно классифицировать как:
- глазные капли;
- глазные примочки;
- порошки для приготовления глазных капель и примочек;
- глазные мягкие лекарственные средства;
- глазные вставки.

ПРОИЗВОДСТВО

При разработке глазных лекарственных средств, в состав которых входят антимикробные консерванты, уполномоченному органу представляют данные, подтверждающие эффективность выбранных консервантов. Метод определения и критерии оценки эффективности консервантов должны соответствовать требованиям статьи *«Эффективность антимикробных консервантов» (5.1.3).*

Глазные лекарственные средства производят с использованием материалов и методов, обеспечивающих стерильность и предотвращающих загрязнение

лекарственных средств и развитие микроорганизмов в соответствии с требованиями статьи *«Методы приготовления стерильных продуктов» (5.1.1).*

При производстве глазных лекарственных средств, содержащих диспергированные частицы, предпринимают меры, обеспечивающие необходимый размер частиц и его контроль.

ИСПЫТАНИЯ

Стерильность (2.6.1). Глазные лекарственные средства должны выдерживать испытание на стерильность. Аппликаторы, прилагаемые отдельно, также должны выдерживать испытание на стерильность. Их извлекают из контейнера в асептических условиях и помещают в емкость с питательной средой до полного погружения. Инкубацию посевов и оценку результатов проводят в соответствии с требованиями испытания на стерильность.

Масса или объем содержимого упаковки *(2.9.28).* Жидкие и мягкие глазные лекарственные средства в однодозовых контейнерах должны выдерживать испытание на массу или объем содержимого контейнера.

ХРАНЕНИЕ

В стерильных воздухонепроницаемых контейнерах с контролем первого вскрытия, если нет других указаний в частной статье.

МАРКИРОВКА

На этикетке указывают название всех добавленных антимикробных консервантов.

Глазные капли

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Глазные капли - стерильные водные или масляные растворы или суспензии, содержащие одно или более действующих веществ и предназначенные для инстилляции в глаз.

Глазные капли могут содержать вспомогательные вещества, например, для обеспечения необходимого осмотического давления, вязкости, создания или стабилизации необходимого значения pH, увеличения растворимости действующих веществ, обеспечения стабильности лекарственного средства. Эти вещества в используемых концентрациях не должны отрицательно влиять на основное терапевтическое действие лекарственного средства и оказывать нежелательного местного раздражения.

Водные лекарственные средства, выпускаемые в многодозовых контейнерах, должны содержать подходящие антимикробные консерванты в необходимых концентрациях, за исключением тех случаев, когда само лекарственное средство обладает достаточным антимикробным действием. Выбранные антимикробные консерванты должны быть совместимы с другими ингредиентами лекарственного средства и сохранять эффективность в течение всего периода использования глазных капель.

Если глазные капли не содержат антимикробных консервантов, они должны быть упакованы при возможности в однодозовые контейнеры. Глазные капли, предназначенные для использования при хирургических процедурах, не должны содержать антимикробных консервантов и должны выпускаться в однодозовых контейнерах.

Глазные капли, представляющие собой растворы, в соответствующих условиях наблюдения должны быть практически прозрачными и практически свободными от частиц.

Глазные капли в виде суспензий могут образовывать осадок, который должен быстро ресуспендироваться при взбалтывании, образуя суспензию, которая должна быть достаточно стабильной и обеспечивать необходимую дозу при введении.

Многодозовые лекарственные средства выпускают в таких контейнерах, которые позволяют дозировать по каплям. Контейнер должен содержать не более 10 мл лекарственного средства, если нет других указаний в частной статье.

ИСПЫТАНИЯ

Размер частиц. Глазные капли в виде суспензий должны выдерживать следующее испытание: если нет других указаний в частной статье, определенное количество суспензии вносят в счетную камеру или с помощью микропипетки наносят на предметное стекло и просматривают под микроскопом площадь, соответствующую 10 мкг твердого действующего вещества. Вначале образец просматривают при малом увеличении (например, х50), отмечая частицы с максимальным размером более 25 мкм. Затем производят измерение этих частиц при большем увеличении (например, от х200 до х500). Для каждого образца, содержащего 10 мкг твердого действующего вещества, должно быть не более 20 частиц с максимальным размером более 25 мкм, и из них не более двух частиц с максимальным размером более 50 мкм. Не допускается наличие частиц с максимальным размером более 90 мкм, ели нет других указаний в частной статье.

МАРКИРОВКА

На этикетке указывают:

- для лекарственных средств в многодозовых контейнерах: срок хранения после вскрытия. Этот срок не должен превышать четыре недели, если нет других указаний в частной статье.

Глазные примочки

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Глазные примочки - стерильные водные растворы, предназначенные для смачивания и промывания глаз, а также для пропитывания материалов, накладываемых на глаза.

Глазные примочки могут содержать вспомогательные вещества, например, для обеспечения необходимого осмотического давления, вязкости, создания или стабилизации необходимого значения pH. Эти вещества в используемых концентрациях не должны отрицательно влиять на действие лекарственного средства и не оказывать нежелательного местного раздражения.

Водные растворы глазных лекарственных средств, выпускаемые в многодозовых контейнерах, должны содержать подходящие антимикробные консерванты в необходимых концентрациях, за исключением тех случаев, когда само лекарственное средство обладает достаточным антимикробным действием. Выбранные антимикробные консерванты должны быть совместимы с другими ингредиентами лекарственного средства и сохранять эффективность в течение всего периода использования глазных примочек.

Если глазные примочки не содержат антимикробных консервантов, они должны быть упакованы в однодозовые контейнеры. Глазные примочки, предназначенные для использования при хирургических процедурах и для оказания первой медицинской помощи, не должны содержать антимикробных консервантов и должны выпускаться только в контейнерах для одноразового использования.

Глазные примочки в соответствующих условиях наблюдения должны быть практически прозрачными и практически свободными от частиц. Многодозовый

контейнер должен содержать не более 200 мл глазной примочки, если нет других указаний в частной статье.

МАРКИРОВКА

На этикетке указывают:

- для однодозовых контейнеров: содержимое должно использоваться только один раз;
- для многодозовых контейнеров: срок хранения лекарственного средства после вскрытия контейнера. Этот срок не должен превышать четырех недель, если нет других указаний в частной статье.

Порошки для приготовления глазных капель и примочек

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Порошки для приготовления глазных капель и примочек - сухое стерильное лекарственное средство, которое перед применением растворяют или суспендируют в предписанной стерильной жидкости.

Они могут содержать вспомогательные вещества, которые облегчают растворение или диспергирование и предотвращают агрегацию частиц, обеспечивают необходимое осмотическое давление, создают или стабилизируют необходимое значение pH или обеспечивают стабильность лекарственного средства.

После растворения или диспергирования они должны соответствовать требованиям для глазных капель или примочек соответственно.

ИСПЫТАНИЯ

Однородность содержания *(2.9.6).* Порошки для приготовления глазных капель и примочек в однодозовых контейнерах с содержание действующего вещества менее 2 мг или менее 2 % от общей массы содержимого должны выдерживать испытание на однородность содержания действующего вещества в единице дозированного лекарственного средства (тест B), если нет других указаний в частной статье. Если лекарственное средство содержит более одного действующего вещества, это требование распространяется только на те вещества, содержание которых соответствуют выше указанным условиям.

Однородность массы *(2.9.5).* Порошки для приготовления глазных капель и примочек в однодозовых контейнерах должны выдерживать испытание на однородность массы для единицы дозированного лекарственного средства. Испытание на однородность массы не требуется, если испытание на однородность содержания предусмотрено для всех действующих веществ.

Глазные мягкие лекарственные средства

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Глазные мягкие лекарственные средства - однородные, стерильные мази, кремы или гели, предназначенные для нанесения на конъюнктиву. Они содержат одно или более действующих веществ, растворенных или диспергированных в подходящей основе.

Глазные мягкие лекарственные средства должны соответствовать требованиям статьи *«Мягкие лекарственные средства для местного применения»)*. Основа не должна раздражать конъюнктиву.

Глазные мягкие лекарственные средства упаковывают в стерильные, необратимо сжимаемые, мелкоемкие тубы со встроенным или приложенным наконечником.

Содержимое тубы должно быть не более 5 г. Тубы должны быть плотно укупорены, чтобы предотвращать микробное загрязнение. Глазные мягкие лекарственные средства могут также выпускать в специально предназначенных однодозовых контейнерах. Контейнеры или наконечники туб должны быть такой формы, чтобы обеспечить введение без загрязнения. Тубы должны обеспечивать контроль первого вскрытия, если нет других указаний в частной статье.

ИСПЫТАНИЯ

Размер частиц. Глазные мягкие лекарственные средства, содержащие диспергированные твердые частицы, должны выдерживать следующее испытание: пробу, содержащую не менее 10 мкг твердого действующего вещества, осторожно наносят тонким слоем и просматривают под микроскопом всю площадь образца. Вначале образец просматривают при малом увеличении (например, х50), отмечая частицы с максимальным размером более 25 мкм. Затем производят измерения этих частиц при большем увеличении (например, от х200 до х500). Для каждого образца, содержащего 10 мкг твердого действующего вещества, должно быть не более 20 частиц с максимальным размером более 25 мкм, и из них не более двух частиц с максимальным размером более 50 мкм. Не допускается наличие частиц с максимальным размером более 90 мкм, если нет других указаний в частной статье.

Глазные вставки

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Глазные вставки - стерильные твердые или мягкие лекарственные средства соответствующего размера и формы, предназначенные для введения в конъюнктивальный мешок для создания окулярного эффекта. Они обычно состоят из матрицы, в которую включено действующее вещество, или действующее вещество окружено мембраной, контролирующей скорость высвобождения. Действующее вещество должно иметь достаточную растворимость в физиологической жидкости и высвобождаться за определенный период времени.

Каждая глазная вставка выпускается в индивидуальном стерильном контейнере.

ПРОИЗВОДСТВО

Производство глазных вставок обеспечивает необходимое высвобождение действующего вещества.

ИСПЫТАНИЯ

Однородность содержания *(2.9.6).* Глазные вставки должны выдерживать испытание на однородность содержания действующего вещества в единице дозированного лекарственного средства (тест А), если нет других указаний в частной статье.

МАРКИРОВКА

На этикетке указывают:

- общее количество действующего вещества в одной вставке;
- дозу, высвобождаемую за единицу времени.

ГРАНУЛЫ

Требования к гранулам, используемым для приготовления растворов или суспензий для орального применения, приведены в статье *«Жидкие лекарственные средства для орального применения»).* Требования данной статьи не

распространяются на гранулы для применения в ветеринарии, если нет других указаний в частной статье.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Гранулы – лекарственные средства, состоящие из твердых сухих, достаточно прочных агрегатов частиц порошка. Гранулы предназначены для приема внутрь. Некоторые из них предназначаются для глотания в целом виде, некоторые подлежат разжёвыванию, некоторые растворяют или диспергируют в воде или другой соответствующей жидкости перед применением. Гранулы содержат одно или более действующих веществ с или без наполнителей и, при необходимости, могут содержать разрешённые к применению красители и ароматизаторы.

Гранулы выпускают в однодозовых или многодозовых контейнерах. Каждую дозу гранул из многодозового контейнера извлекают при помощи соответствующего приспособления для отмеривания предписанного количества. Каждая доза однодозового лекарственного средства должна быть упакована в отдельный контейнер, например пакетик или флакон.

Контейнеры для гранул, должны соответствовать требованиям статей *«Материалы, используемые для производства контейнеров» (3.1 и подразделы)* и *«Контейнеры» (3.2 и подразделы),* если нет других указаний в частной статье.

Гранулы можно классифицировать как:

- гранулы «шипучие»;
- гранулы, покрытые оболочкой;
- гранулы кишечно-растворимые;
- гранулы с модифицированным высвобождением.

ПРОИЗВОДСТВО

При производстве, упаковке, хранении и реализации гранул предпринимают меры, обеспечивающие микробиологическую чистоту в соответствии с требованиями статьи *«Микробиологическая чистота лекарственных средств» (5.1.4).*

ИСПЫТАНИЯ

Однородность содержания *(2.9.6).* Гранулы в однодозовых контейнерах с содержанием действующего вещества менее 2 мг или менее 2% от общей массы содержимого должны выдерживать испытание на однородность содержания действующего вещества в единице дозированного лекарственного средства (тест B), если нет других указаний в частной статье. Если лекарственное средство содержит более одного действующего вещества, это требование распространяется только на те вещества, содержание которых соответствуют выше указанным условиям.

Однородность массы *(2.9.5).* Гранулы в однодозовых контейнерах, за исключением гранул, покрытых оболочкой, должны выдерживать испытание на однородность массы для единицы дозированного лекарственного средства. Испытание на однородность массы не требуется, если испытание на однородность содержания предусмотрено для всех действующих веществ.

Однородность массы одной дозы в многодозовых контейнерах *(2.9.27).* Гранулы в многодозовых контейнерах должны выдерживать испытание на однородность массы одной дозы, высвобожденной из многодозового контейнера.

ХРАНЕНИЕ

Если лекарственное средство содержит летучие вещества или содержимое должно быть защищено, хранят в воздухонепроницаемом контейнере.

Гранулы «шипучие»

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Гранулы «шипучие» - гранулы, не покрытые оболочкой, главным образом содержащие кислоты и карбонаты или гидрокарбонаты, которые при наличии воды быстро вступают в реакцию с выделением углекислого газа. Они предназначены для растворения или диспергирования в воде перед применением.

ИСПЫТАНИЯ

Распадаемость. Одну дозу гранул «шипучих» помещают в лабораторный стакан с 200 мл *воды Р* при температуре от 15^{0}С до 25^{0}С; выделяются многочисленные пузырьки газа. Когда выделение газа вокруг отдельных частиц прекращается, гранула считается распавшейся в результате растворения или диспергирования в воде. Повторяют процедуру на пяти других дозах. Гранулы выдерживают испытание, если каждая из шести доз распадается в течение не более 5 мин.

ХРАНЕНИЕ

Хранят в воздухонепроницаемых контейнерах, если нет других указаний в частной статье.

Гранулы, покрытые оболочкой

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Гранулы, покрытые оболочкой - лекарственные средства в многодозовых контейнерах, обычно состоящие из гранул, покрытых одним или несколькими слоями смеси из различных вспомогательных веществ.

ПРОИЗВОДСТВО

Вещества, используемые для получения оболочки, обычно наносят в виде раствора или суспензии в условиях, в которых происходит испарение растворителя.

ИСПЫТАНИЯ

Растворение. Испытание проводят для подтверждения соответствующего высвобождения действующего вещества или веществ, например, одним из способов, описанных в статье *«Тест «Растворение» для твердых дозированных форм» (2.9.3).*

Гранулы кишечно-растворимые

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Гранулы кишечно-растворимые – гранулы с модифицированным высвобождением, которые устойчивые к действию желудочного сока и способны высвобождать действующее вещество или вещества в кишечном соке. Это достигается покрытием гранул материалом, устойчивым к желудочному соку, или другими подходящими способами.

ПРОИЗВОДСТВО

Проводят испытание, которое подтверждает, что технология обеспечивает необходимое высвобождение действующего вещества или веществ.

ИСПЫТАНИЯ

Растворение. Проводят испытание для подтверждения соответствующего высвобождения действующего вещества или веществ, например, одним из способов, описанным в статье *«Тест «Растворение» для твердых дозированных форм» (2.9.3).*

Гранулы с модифицированным высвобождением

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Гранулы с модифицированным высвобождением – гранулы, покрытые оболочкой или без оболочки, полученные с использованием специальных вспомогательных веществ или специальных способов, которые, отдельно или вместе, предназначенные для изменения скорости, места или времени высвобождения действующего вещества.

Различают гранулы с модифицированным высвобождением пролонгированного действия и замедленного действия.

ПРОИЗВОДСТВО

Проводят испытание, подтверждающее соответствующее высвобождение действующего вещества или веществ.

ИСПЫТАНИЕ

Растворение. Проводят испытание для подтверждения соответствующего высвобождения действующего вещества или веществ, например, одним из способов, описанных в статье *«Тест «Растворение» для твердых дозированных форм» (2.9.3).*

ЖЕВАТЕЛЬНЫЕ ЛЕКАРСТВЕННЫЕ РЕЗИНКИ

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Жевательные лекарственные резинки - твердые дозированные лекарственные средства с основой, состоящей главным образом из резины, предназначенные для жевания, но не глотания.

Жевательные лекарственные резинки содержат одно или несколько действующих веществ, которые высвобождаются при жевании. В результате растворения или диспергирования действующих веществ в слюне, жевательные резинки используют:

- для местного лечения заболеваний полости рта;
- для системного лечения после всасывания через слизистую щек или желудочно-кишечного тракта.

ПРОИЗВОДСТВО

Жевательные лекарственные резинки изготавливают из основы - безвкусной жевательной резины, которая состоит из натуральных или синтетических эластомеров. Они могут содержать вспомогательные вещества, такие как смягчители, подсластители, вкусовые добавки, стабилизаторы, пластификаторы и красители.

Жевательные лекарственные резинки изготавливают путем или сжатия, или размягчения, или сплавления основы резины с другими веществами, которые добавляют последовательно. В последнем случае жевательные резинки обрабатывают для придания резинке товарного вида. Жевательные лекарственные резинки могут быть покрыты, например, если необходима защита от влаги и света.

Проводят испытание, подтверждающее высвобождение действующего вещества или веществ, если нет других указаний в частной статье.

В процессе производства, упаковки, хранения и реализации жевательных лекарственных резинок предпринимают меры, обеспечивающие микробиологическую чистоту в соответствии с требованиями статьи *«Микробиологическая чистота лекарственных средств» (5.1.4).*

ИСПЫТАНИЯ

Однородность содержания *(2.9.6).* Жевательные лекарственные резинки с содержанием действующего вещества менее 2 мг или менее 2 % от общей массы содержимого должны выдерживать испытание на однородность содержания действующего вещества в единице дозированного лекарственного средства (тест А), если нет других указаний в частной статье. Если лекарственное средство содержит более одного действующего вещества, это требование распространяется только на те составляющие, содержание которых соответствуют выше указанным условиям.

Однородность массы *(2.9.5)*. Покрытые жевательные резинки и, если нет других указаний в частной статье, непокрытые жевательные резинки должны выдерживать испытание на однородность массы для единицы дозированного лекарственного средства. Испытание на однородность массы не требуется, если испытание на однородность содержания предусмотрено для всех действующих веществ.

ХРАНЕНИЕ

Непокрытые жевательные лекарственные резинки предохраняют от воздействия влаги и света, если нет других указаний в частной статье.

ЖИДКИЕ ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА ДЛЯ НАРУЖНОГО ПРИМЕНЕНИЯ

Требования данной статьи не распространяются на лекарственные средства, предназначенные для системного действия, если нет других указаний в частной статье.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Жидкие лекарственные средства для наружного применения – это различные по вязкости лекарственные средства, предназначенные для местного или трансдермального высвобождения действующих веществ. К жидким лекарственным средствам для наружного применения относятся растворы, эмульсии или суспензии, которые содержат одно или более действующих веществ в соответствующем носителе. Они могут содержать соответствующие антимикробные консерванты, антиоксиданты и другие вспомогательные вещества, такие как стабилизаторы, эмульгаторы и загустители.

Эмульсии могут расслаиваться, но легко восстанавливаются при взбалтывании.

Суспензии могут образовывать осадок, который быстро ресуспендируется при взбалтывании, образуя суспензию достаточно стабильную, чтобы обеспечить однородность лекарственного средства при дозировании.

Контейнеры для жидких лекарственных средств должны соответствовать требованиям статей *«Материалы, используемые для производства контейнеров» (3.1 и подразделы) «Контейнеры» (3.2 и подразделы),* если нет других указаний в частной статье.

Жидкие лекарственные средства, выпускаемые в контейнерах под давлением, должны соответствовать требованиям статьи «*Лекарственные средства, находящиеся под давлением».*

Лекарственные средства, предназначенные для применения на сильно поврежденных кожных покровах, должны быть стерильными

Лекарственные средства для наружного применения можно классифицировать как:

- шампуни;
- пены для кожи.

ПРОИЗВОДСТВО

При разработке жидких лекарственных средств для наружного применения, в состав которых входят антимикробные консерванты, уполномоченному органу представляют данные, подтверждающие эффективность выбранных консервантов. Метод определения и критерии оценки эффективности консервантов должны соответствовать требованиям статьи *«Эффективность антимикробных консервантов» (5.1.3).*

При производстве, упаковке, хранении и реализации жидких лекарственных средств для наружного применения предпринимают меры, обеспечивающие микробиологическую чистоту в соответствии с требованиями статьи *«Микробиологическая чистота лекарственных средств» (5.1.4).*

Стерильные жидкие лекарственные средства для наружного применения производят с использованием материалов и методов, обеспечивающих стерильность и предотвращающих загрязнение лекарственных средств и развитие микроорганизмов в соответствии с требованиями статьи *«Методы приготовления стерильных продуктов» (5.1.1).*

При производстве жидких лекарственных средств, содержащих диспергированные частицы, предпринимают меры, обеспечивающие необходимый размер частиц и его контроль.

ИСПЫТАНИЯ

Определение массы или объёма одной дозы *(2.9.28).* Жидкие лекарственные для наружного применения в однодозовых контейнерах должны выдерживать испытание на массу или объем содержимого контейнера.

Стерильность *(2.6.1).* Если на этикетке указано, что лекарственное средство стерильно, оно должно выдерживать испытание на стерильность.

ХРАНЕНИЕ

Если лекарственное средство стерильно, хранят в стерильных, воздухонепроницаемых контейнерах с контролем первого вскрытия, если нет других указаний в частной статье.

МАРКИРОВКА

На этикетке указывают:

- название всех добавленных антимикробных консервантов;
- «стерильно», если необходимо.

Шампуни

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Шампуни - жидкие или иногда мягкие лекарственные средства, предназначенные для применения на кожу головы и последующего смывания их водой. При растирании с водой они обычно образуют пену.

Шампуни являются эмульсиями, суспензиями или растворами. Они обычно содержат поверхностно-активные вещества.

Пены для кожи

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Пены для кожи должны соответствовать требованиям статьи *«Пены медицинские».*

ЖИДКИЕ ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА ДЛЯ ОРАЛЬНОГО ПРИМЕНЕНИЯ

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Жидкие лекарственные средства для орального применения представляют собой растворы, эмульсии или суспензии, содержащие одно или более действующих веществ в соответствующем носителе; они могут также состоять только из жидких действующих веществ (оральные жидкости). Некоторые лекарственные средства для орального применения изготавливают разведением жидких концентратов или порошков или гранул для приготовления оральных растворов или суспензий, оральных капель или сиропов, используя соответствующий растворитель.

Растворитель для всех лекарственных средств для орального применения выбирают, исходя из природы действующего вещества или веществ, и он должен обеспечивать органолептические свойства лекарственному средству в зависимости от его предназначения.

Жидкие лекарственные средства для орального применения могут содержать подходящие антимикробные консеранты, антиоксиданты и другие вспомогательные вещества, которые обеспечивают диспергирование, суспендирование, а также загустители, эмульгаторы, вещества, предназначенные для создания или стабилизации pH, для обеспечения смачивания и растворимости, стабилизаторы, ароматизаторы, вкусовые добавки и красители, разрешённые к медицинскому применению.

Эмульсии могут расслаиваться, однако быстро восстанавливаются при взбалтывании.

Суспензии могут образовывать осадок, который быстро ресуспендируется при взбалтывании, образуя суспензию достаточно стабильную, чтобы обеспечить однородность лекарственного средства при дозировании.

Жидкие лекарственные средства, выпускаемые в контейнерах под давлением, должны соответствовать требованиям статьи «*Лекарственные средства, находящиеся под давлением».*

Жидкие лекарственные средства для орального применения можно классифицировать как:

- оральные растворы, эмульсии и суспензии;
- порошки и гранулы для приготовления оральных растворов и суспензий;
- оральные капли;
- порошки для приготовления оральных капель;
- сиропы;
- порошки и гранулы для приготовления сиропов.

ПРОИЗВОДСТВО

При разработке жидких лекарственных средств для орального применения, в состав которых входят антимикробные консерванты, уполномоченному органу представляют данные, подтверждающие эффективность выбранных консервантов. Метод определения и критерии оценки эффективности консервантов должны соответствовать требованиям статьи *«Эффективность антимикробных консервантов» (5.1.3).*

При производстве, упаковке, хранении и реализации жидких лекарственных средств для орального применения предпринимают меры, обеспечивающие микробиологическую чистоту в соответствии с требованиями статьи *«Микробиологическая чистота лекарственных средств» (5.1.4).*

При производстве лекарственных средств для орального применения, содержащих диспергированные частицы, предпринимают меры, обеспечивающие необходимый размер частиц и его контроль.

ИСПЫТАНИЯ

Однородность содержания *(2.9.6).* Если нет других указаний в частной статье, жидкие лекарственные средства в виде суспензий в однодозовых контейнерах должны выдерживать следующее испытание: после взбалтывания освобождают каждый контейнер как можно полнее и проводят испытание на определение содержания действующего вещества в каждом контейнере. Лекарственное средство должно выдерживать испытание на однородность содержания действующего вещества в единице дозированного лекарственного средства (тест В).

Однородность массы *(2.9.5).* Жидкие лекарственные средства в виде растворов или эмульсий в однодозовых контейнерах должны выдерживать следующее испытание: освобождают каждый из 20 контейнеров как можно полнее, взвешивают содержимое каждого контейнера и определяют среднюю массу содержимого. Масса содержимого не более чем двух контейнеров может отклоняться более чем на 10 % от средней массы и масса содержимого ни одного контейнера не должна отклоняться более чем на 20 %.

Доза и однородность дозирования оральных капель. Количество капель, соответствующее одной дозе, с помощью капающего или дозирующего устройства помещают в мерный цилиндр. Скорость капания не должна превышать 2 капли в секунду. Жидкость взвешивают, прибавляют еще одну дозу и вновь взвешивают; повторное прибавление с последующим взвешиванием проводят до тех пор, пока не будет взвешено 10 доз. Определяют среднюю массу дозы. Масса ни одной дозы не должна отклоняться более чем на 10 % от средней массы. Суммарная масса 10 доз не должна отличаться более чем на 15 % от номинальной массы 10 доз. Если необходимо, измеряют общий объём 10 доз. Объём не должен отличаться более чем на 15 % от номинального объёма 10 доз.

Определение массы или объёма содержимого контейнера *(2.9.28).* Жидкие лекарственные средства для орального применения в однодозовых контейнерах должны выдерживать испытание на массу или объем содержимого контейнера.

Однородность массы доз в многодозовых контейнерах *(2.9.27).* Жидкие лекарственные средства для орального применения в многодозовых контейнерах должны выдерживать испытание на однородность массы одной дозы, высвобожденной из многодозового контейнера.

МАРКИРОВКА

На этикетке указывают название всех добавленных антимикробных консервантов.

Оральные растворы, эмульсии и суспензии

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Оральные растворы, эмульсии и суспензии выпускают в однодозовых или многодозовых контейнерах. Каждая доза из многодозового контейнера применяется с помощью подходящего дозирующего приспособления, предназначенного для измерения предписанного объема. Приспособление обычно представляет собой

мерную ложку или стаканчик вместимостью 5 мл или кратного обозначенному объему, либо оральный шприц для другого объёма.

Порошки и гранулы для приготовления оральных растворов и суспензий

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Порошки и гранулы для приготовления оральных растворов и суспензий в основном соответствуют определениям статьи «*Порошки для орального применения*» или статьи «*Гранулы*» соответственно. Они могут содержать также вспомогательные вещества, которые способствуют диспергированию или растворению или предотвращают агрегацию частиц.

После растворения или суспендирования они должны соответствовать требованиям, которые предъявляют к растворам или суспензиям для орального применения соответственно.

ИСПЫТАНИЯ

Однородность содержания *(2.9.6)*. Порошки или гранулы в однодозовых контейнерах с содержанием действующего вещества менее 2 мг или менее 2% от общей массы содержимого должны выдерживать испытание на однородность содержания действующего вещества в единице дозированного лекарственного средства (тест В), если нет других указаний в частной статье. Если лекарственное средство содержит более одного действующего вещества, это требование распространяется только на те вещества, содержание которых соответствуют выше указанным условиям.

Однородность массы *(2.9.5).* Порошки и гранулы в однодозовых контейнерах должны выдерживать испытание на однородность массы для единицы дозированного лекарственного средства. Испытание на однородность массы не требуется, если испытание на однородность содержания предусмотрено для всех действующих веществ.

МАРКИРОВКА

На этикетке указывают:

- способ приготовления раствора или суспензии;
- условия и срок хранения после приготовления.

Оральные капли

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Оральные капли - растворы, эмульсии или суспензии, которые принимают малыми объемами – каплями с помощью подходящего дозирующего устройства.

МАРКИРОВКА

На этикетке указывают количество капель в одном миллилитре или грамме лекарственного средства, если доза измеряется в каплях.

Порошки для приготовления оральных капель

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Порошки для приготовления оральных капель в основном соответствуют определениям статьи «*Порошки для орального применения*». Они могут содержать вспомогательные вещества, облегчающие растворение или диспергирование в соответствующем растворителе, или предотвращают агрегацию частиц.

После растворения или суспендирования они должны соответствовать требованиям, предъявляемым к оральным каплям.

ИСПЫТАНИЯ

Однородность содержания *(2.9.6)*. Порошки для приготовления оральных капель в однодозовых контейнерах с содержанием действующего вещества менее 2 мг или менее 2% от общей массы содержимого должны выдерживать испытание на однородность содержания действующего вещества в единице дозированного лекарственного средства (тест В), если нет других указаний в частной статье. Если лекарственное средство содержит более одного действующего вещества, это требование распространяется только на те вещества, содержание которых соответствуют выше указанным условиям.

Однородность массы *(2.9.5).* Порошки для приготовления оральных капель в однодозовых контейнерах должны выдерживать испытание на однородность массы для единицы дозированного лекарственного средства. Испытание на однородность массы не требуется, если испытание на однородность содержания предусмотрено для всех действующих веществ

Сиропы

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Сиропы – жидкие густоватые лекарственные средства, характеризующиеся сладким вкусом. Они могут содержать сахарозу в концентрации не менее 45% *м/м*. Сладкий вкус может быть достигнут использованием других полиолов или подсластителей. Сиропы обычно содержат ароматизаторы или другие вкусовые добавки. Каждая доза из многодозового контейнера применяется при помощи подходящего дозирующего приспособления, предназначенного для измерения предписанного объема. Приспособление обычно представляет собой мерную ложку или стаканчик вместимостью 5 мл или кратного обозначенному объему.

МАРКИРОВКА

На этикетке указывают название и концентрацию полиола или подсластителя.

Порошки и гранулы для приготовления сиропов

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Порошки и гранулы для приготовления сиропов в основном соответствуют определениям статьи «*Порошки для орального применения*» или статьи «*Гранулы*» соответственно. Они могут содержать вспомогательные вещества, облегчающие растворение.

После растворения они должны соответствовать требованиям, предъявляемым к сиропам.

ИСПЫТАНИЯ

Однородность содержания *(2.9.6)*. Порошки и гранулы для приготовления сиропа в однодозовых контейнерах с содержанием действующего вещества менее 2 мг или менее 2% от общей массы содержимого должны выдерживать испытание на однородность содержания действующего вещества в единице дозированного лекарственного средства (тест В), если нет других указаний в частной статье. Если лекарственное средство содержит более одного действующего вещества, это требование распространяется только на те вещества, содержание которых соответствуют выше указанным условиям.

Однородность массы *(2.9.5).* Порошки и гранулы для приготовления сиропа в однодозовых контейнерах должны выдерживать испытание на однородность массы для единицы дозированного лекарственного средства. Испытание на однородность массы не требуется, если испытание на однородность содержания предусмотрено для всех действующих веществ.

ИММУННЫЕ СЫВОРОТКИ ДЛЯ МЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Иммунные сыворотки для медицинского применения – это очищенные лекарственные средства, содержащие иммуноглобулины, полученные из сыворотки иммунизированных животных. Иммуноглобулины обладают способностью специфической нейтрализации ядов или токсинов, сформированных бактериями или некоторыми комбинациями бактерий, вирусов или других антигенов.

ПРОИЗВОДСТВО

Иммунные сыворотки получают от здоровых животных, которых иммунизируют инъекциями соответствующих токсинов или анатоксинов, ядов, суспензиями микроорганизмов или других антигенов. В период иммунизации животных их нельзя лечить пенициллином. Иммуноглобулины, содержащие иммунизирующие антитела, могут быть получены из сыворотки посредством ферментной обработки и фракционного осаждения или другими химическими или физическими методами.

Допускается добавление подходящего антимикробного консерванта. Если препарат выпускается в многодозовой упаковке, то добавление антимикробного консерванта обязательно. Готовые стерильные продукты помещаются в стерильные емкости, которые закупориваются таким образом, чтобы исключить любое загрязнение.

Продукты могут быть высушены вымораживанием путем уменьшения содержания воды в готовом продукте до уровня не более 1,0 % м/м.

Иммунные сыворотки, приготовленные путем ферментной обработки и фракционного осаждения, наиболее устойчивы при значении pH около 6. При таком значении pH иммунные сыворотки теряют не более 5 % активности в год, если они хранятся при температуре 20 °C и не более 20 % в год, если они хранятся при температуре 37 °C.

Производственный метод может считаться пригодным, если доказано, что при тестировании готовый продукт будет выдерживать испытание на аномальную токсичность для иммуносывороток и вакцин для медицинского применения (2.6.9).

ХАРАКТЕРИСТИКИ

Иммунные сыворотки – почти бесцветные или слабо желтые жидкости, без помутнения. Лиофилизированные иммунные сыворотки имеют вид белых или бледно-желтых порошков или уплотненной массы, легко растворимых в воде до образования бесцветных или бледно-желтых растворов с теми же характеристиками, что и соответствующие жидкие формы.

ИСПЫТАНИЯ

Данные требования относятся к жидким иммунным сывороткам и приготовленным из лиофилизатов растворам.

pH (2.2.3). pH 6,0 – 7,0.

Инородные белки. При проведении испытания на осаждение с определенными антисыворотками обнаруживаются протеины только указанного вида животного.

Общий белок. Не более 170 г/л. Определение азота проводится после минерализации серной кислотой (2.5.9), полученный результат умножают на 6,25.

Альбумины. При электрофоретическом исследовании в иммуносыворотке обнаруживаются только следы альбуминов, если не указано иначе в частной статье.

Фенол (2.5.15). Если иммуносыворотки содержат фенол, то его концентрация должна быть не более 2,5 г/л.

Стерильность (2.6.1). Иммунные сыворотки должны выдерживать тест на стерильность.

АКТИВНОСТЬ

Если необходимо, проводятся биологические пробы, как указывается в частной статье, и результаты выражаются в Международных Единицах на миллилитр.

ХРАНЕНИЕ

Хранить при температуре 5±3°C. Жидкие иммуносыворотки не должны подвергаться замораживанию.

Срок годности. Срок годности исчисляется с начала испытания на активность. Это относится к сывороткам, хранящимся в указанных условиях.

МАРКИРОВКА

На этикетке указывается:

– наименование препарата,

– число Международных Единиц на миллилитр, там, где это применимо,

– номер партии или другого контрольного знака,

– область применения,

– условия хранения,

– срок годности, за исключением контейнеров емкостью 1 мл или менее, упакованных индивидуально. В этом случае срок годности наносится на общую упаковку с указанием, что данная емкость должна храниться в общей упаковке до момента ее использования,

– название разновидности животного, от которого получена иммунная сыворотка,

– наименование и количество любого антимикробного консерванта или другого вещества, добавленного в иммунную сыворотку,

– вещества, которые могут вызвать какую-либо неблагоприятную реакцию и любые противопоказания к использованию препарата,

– для высушенной сублимацией (вымораживанием) сыворотки:

– наименование или состав и объем жидкости для приготовления, которая будет добавлена,

– предупреждение о том, что иммуносыворотка должна использоваться сразу же после приготовления,

– наименование и адрес изготовителя.

КАПСУЛЫ

Требования данной статьи не обязательны для лекарственных средств, изготовленных в виде капсул, предназначенных к применению не оральным, а другим способом. Требования к таким лекарственным средствам приведены в других общих статьях, например «Лекарственные средства для ректального применения» или «Лекарственные средства для вагинального применения».

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Капсулы - твердые лекарственные средства с твердой или мягкой оболочкой разной формы и вместимости. Капсула содержит одну дозу действующего вещества и предназначена для орального применения.

Оболочки капсул изготавливают из желатина или других веществ, консистенция оболочки может быть обеспечена путем добавления таких веществ как глицерин или сорбит. В состав оболочки могут входить такие вспомогательные вещества, как поверхностно-активные вещества, непрозрачные наполнители, антимикробные консерванты, подсластители, красители, разрешенные к медицинскому применению, ароматизаторы и др. Поверхность капсул может быть маркирована.

Содержимое капсул может быть твердым, жидким или пастообразным. Оно состоит из одного или более действующих веществ и вспомогательных веществ, таких как растворители, разбавители, смазывающие, разрыхляющие вещества и др., или без вспомогательных веществ. Содержимое капсул не должно разрушать оболочку. Однако оболочка, напротив, под воздействием пищеварительных соков должна высвобождать содержимое капсул.

#Капсулы должны иметь гладкую поверхность без повреждений и видимых воздушных и механических включений.

Контейнеры для капсул должны соответствовать требованиям статей *«Материалы, используемые для производства контейнеров» (3.1 и подразделы) и «Контейнеры» (3.2 и подразделы),* если нет других указаний в частной статье.

Капсулы могут быть классифицированы как:

- капсулы твердые;
- капсулы мягкие;
- капсулы кишечно-растворимые;
- капсулы с модифицированным высвобождением;
- облатки.

ПРОИЗВОДСТВО

В процессе производства, упаковки, хранения и реализации капсул предпринимают меры, обеспечивающие микробиологическую чистоту в соответствии с требованиями статьи *«Микробиологическая чистота лекарственных средств» (5.1.4).*

ИСПЫТАНИЯ

Однородность содержания *(2.9.6).* Капсулы с содержанием действующего вещества менее 2 мг или менее 2% от общей массы содержимого должны выдерживать испытание на однородность содержания действующего вещества в единице дозированного лекарственного средства (тест B), если нет других указаний в частной статье. Если лекарственное средство содержит более одного действующего вещества, это требование распространяется только на те вещества, содержание которых соответствуют выше указанным условиям.

Однородность массы *(2.9.5).* Капсулы должны выдерживать испытание на однородность массы для единицы дозированного лекарственного средства. Испытание на однородность массы не требуется, если испытание на однородность содержания предусмотрено для всех действующих веществ.

Растворение. Испытание проводят для подтверждения высвобождения действующего вещества или веществ, например, одним из способов, описанных в статье *«Тест «Растворение» для твердых дозированных форм» (2.9.3).*

Если проводится испытание по показателю «Растворение», испытание по показателю «Распадаемость» не требуется.

ХРАНЕНИЕ

Хранят при температуре не выше 30°C, если нет других указаний в частной статье.

МАРКИРОВКА

На этикетке указывают название всех добавленных антимикробных консервантов.

Капсулы твердые

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Капсулы твердые имеют оболочку, состоящую из двух предварительно изготовленных частей цилиндрической формы, один конец которых закруглен и закрыт, а другой конец открыт.

Обе части должны свободно входить одна в другую, не образуя зазоров, и могут иметь специальные канавки и выступы для обеспечения «замка».

В зависимости от вместимости изготавливают капсулы восьми номеров – от 000 (наибольшего размера) до 5 (наименьшего размера). Номера капсул и соответствующая им вместимость приведены в таблице:

Номер	000	00	0	1	2	3	4	5
Средняя вместимость капсулы, мл	1,37	0,95	0,68	0,5	0,37	0,3	0,21	0,13

ПРОИЗВОДСТВО

Действующее вещество или вещества, обычно в твердом состоянии (в виде порошка или гранул), засыпают в одну из частей оболочки и закрывают второй частью. Надежность закрытия капсулы может быть усилена соответствующими способами.

ИСПЫТАНИЯ

Распадаемость. Капсулы твердые должны выдерживать испытание на распадаемость таблеток и капсул *(2.9.1)*. В качестве жидкой среды используют *воду Р*. Если указано в частной статье, в качестве жидкой среды может быть использована *0,1М кислота хлористоводородная* или *искусственный желудочный сок Р*. Если капсула всплывает на поверхность воды, следует использовать диск. Прибор включают на 30 мин, если нет других указаний в частной статье, и исследуют состояние капсул. Лекарственное средство выдерживает испытание, если все шесть капсул распались.

Капсулы мягкие

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Капсулы мягкие обычно имеют более толстую оболочку, чем капсулы твердые. Оболочка цельная и имеет различные формы.

Капсулы мягкие могут быть различных размеров, вместимостью до 1,5 мл. Оболочка может быть жесткой или эластичной в зависимости от содержания пластификаторов.

ПРОИЗВОДСТВО

Капсулы мягкие обычно формируют, заполняют и запечатывают в одной операции.

Жидкости могут быть заключены в капсулу непосредственно; твердые вещества обычно растворяют или диспергируют в подходящем растворителе для получения раствора или суспензии пастообразной консистенции.

Возможна частичная миграция компонентов содержимого капсулы в оболочку и наоборот, обусловленная природой контактирующих материалов и поверхностей.

ИСПЫТАНИЯ

Распадаемость. Капсулы мягкие должны выдерживать испытание на распадаемость таблеток и капсул *(2.9.1)*. В качестве жидкой среды используют *воду Р*. Если указано в частной статье, в качестве жидкой среды может быть использована *0,1М кислота хлористоводородная* или *искусственный желудочный сок Р*. В каждую стеклянную трубку помещают диск. Жидкие действующие вещества, распределенные в мягкой капсуле, могут обволакивать диск; в таких случаях или, если указано в частной статье, диск не используют. Прибор включают на 30 мин, если нет других указаний в частной статье, и исследуют состояние капсул. Если капсулы не полностью распались из-за прилипания к дискам, испытание повторяют на следующих шести капсулах без дисков. Лекарственное средство выдерживает испытание, если все шесть капсул распались.

Капсулы кишечно-растворимые

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Капсулы кишечно-растворимые - капсулы с замедленным высвобождением, которые должны быть устойчивыми к действию желудочного сока и высвобождать действующее вещество или вещества в кишечном соке.

Как правило, они изготовлены путем заполнения капсул гранулами или частицами, покрытыми кислотоустойчивой оболочкой или, в некоторых случаях, путем покрытия твердых или мягких капсул кислотоустойчивой оболочкой (кишечные капсулы).

ПРОИЗВОДСТВО

Для капсул, заполненных гранулами или частицами, покрытыми кислотоустойчивой оболочкой, проводят испытание, подтверждающее высвобождение действующего вещества или веществ.

Капсулы с модифицированным высвобождением

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Капсулы с модифицированным высвобождением – твердые или мягкие капсулы, которые имеют в составе содержимого или оболочки, или в том и другом одновременно специальные вспомогательные вещества, или изготовлены специальным методом, предназначенные для изменения скорости, места или времени высвобождения действующего вещества.

Различают капсулы с модифицированным высвобождением пролонгированного действия и замедленного действия.

ПРОИЗВОДСТВО

Проводят испытание, подтверждающее соответствующее высвобождение действующего вещества или веществ.

ИСПЫТАНИЯ

Распадаемость. Для капсул с кислотоустойчивой оболочкой проводят испытание на распадаемость *(2.9.1)* со следующими изменениями: в качестве жидкой среды используют *0,1М кислоту хлористоводородную* и прибор включают на 2 ч, если нет других указаний в частной статье, без дисков. Исследуют состояние капсул. Время устойчивости в кислой среде колеблется в зависимости от состава. Обычно оно составляет от 2 ч до 3 ч, но, в любом случае, оно должно быть не менее 1 ч. Ни одна из капсул не должна обнаруживать признаков распада или разрывов, через которые возможен выход содержимого. Кислоту заменяют *фосфатным буферным раствором pH 6,8 Р*. Если указано в частной статье, может быть использован буферный раствор pH 6,8 с добавлением *порошка панкреатина Р* (например, 0,35 г *порошка панкреатина Р* на 100 мл буферного раствора). В каждую стеклянную трубку помещают диск. Прибор включают на 60 мин и исследуют капсулы. Если капсулы не выдержали испытание из-за прилипания к дискам, испытание повторяют на следующих шести капсулах без дисков. Лекарственное средство выдерживает испытание, если все шесть капсул распались.

Растворение. Для капсул, заполненных гранулами или частицами, покрытыми кислотоустойчивой оболочкой, проводят испытание, подтверждающее высвобождение действующего вещества или веществ, например, одним из способов, описанным в статье *«Тест «Растворение» для твердых дозированных форм» (2.9.3).*

Облатки

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Облатки - твердые лекарственные средства с твердой оболочкой и содержат одну дозу действующего вещества или веществ. Оболочку облатки изготавливают из пресного хлеба, изготовленного из рисовой муки. Оболочка состоит из двух, предварительно изготовленных, плоских цилиндрических частей. Перед применением облатку погружают в воду на несколько минут, затем проглатывают, запивая водой.

МАРКИРОВКА

На этикетке указывают способ применения облатки.

ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА ДЛЯ ВАГИНАЛЬНОГО ПРИМЕНЕНИЯ

Лекарственные средства для вагинального применения – жидкие, мягкие или твердые лекарственные средства, предназначенные для применения во влагалище с целью обеспечения местного действия. Они содержат одно или более действующих веществ в соответствующей основе.

Контейнеры для лекарственных средств для вагинального применения, должны соответствовать требованиям статей *«Материалы, используемые для производства контейнеров» (3.1 и подразделы)* и *«Контейнеры» (3.2 и подразделы),* если нет других указаний в частной статье.

Лекарственные средства для вагинального применения можно классифицировать как:

- пессарии;
- вагинальные таблетки;
- вагинальные капсулы;
- вагинальные растворы, эмульсии и суспензии;
- таблетки для приготовления вагинальных растворов и суспензий;
- мягкие лекарственные средства для вагинального применения;
- вагинальные пены;
- вагинальные тампоны.

ПРОИЗВОДСТВО

При производстве, упаковке, хранении и реализации лекарственных средств для вагинального применения предпринимают меры, обеспечивающие микробиологическую чистоту в соответствии с требованиями статьи *«Микробиологическая чистота лекарственных средств» (5.1.4).*

ИСПЫТАНИЯ

Однородность содержания *(2.9.6)*. Твердые лекарственные средства в однодозовых контейнерах с содержанием действующего вещества менее 2 мг или менее 2% от общей массы содержимого должны выдерживать испытание на однородность содержания действующего вещества в единице дозированного лекарственного средства (тест А – вагинальные таблетки или тест В – пессарии, вагинальные капсулы), если нет других указаний в частной статье. Если лекарственное средство содержит более одного действующего вещества, это требование распространяется только на те вещества, содержание которых соответствуют выше указанным условиям.

Однородность массы *(2.9.5).* Твердые лекарственные средства в однодозовых контейнерах должны выдерживать испытание на однородность массы для единицы дозированного лекарственного средства. Испытание на однородность массы не требуется, если испытание на однородность содержания предусмотрено для всех действующих веществ.

Определение массы или объема содержимого контейнера *(2.9.28).* Жидкие и мягкие лекарственные средства для вагинального применения в однодозовых контейнерах должны выдерживать испытание на массу или объем содержимого контейнера.

Растворение. Проводят испытание для подтверждения соответствующего высвобождения действующего вещества твердых лекарственных средств в

однодозовых контейнерах, например, одним из способов, описанных в статье *«Тест «Растворение» для твердых дозированных форм» (2.9.3).*

Если проводят испытание по показателю «Растворение», испытание по показателю «Распадаемость» не требуется.

Пессарии

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Пессарии – твердые однодозовые лекарственные средства. Пессарии могут быть различной формы, обычно яйцевидной; по объему и консистенции должны соответствовать вагинальному применению.

Пессарии содержат одно или более действующих веществ, диспергированных или растворенных в подходящей основе, которая растворяется или диспергируется в воде или расплавляется при температуре тела. В состав пессариев, если необходимо, могут входить вспомогательные вещества, такие как разбавители, адсорбенты, поверхностно-активные и смачивающие вещества, антимикробные консерванты, а также красители, разрешенные к медицинскому применению.

ПРОИЗВОДСТВО

Пессарии обычно изготавливают методом выливания. При производстве пессариев предусматривают меры, обеспечивающие необходимый размер частиц действующего вещества или веществ, диспергированных или растворенных в подходящей основе, и его контроль. Если необходимо, действующее вещество или вещества предварительно измельчают и просеивают через соответствующее сито.

Если пессарии изготавливают методом выливания, приготовленную массу предварительно расплавляют при нагревании и разливают в соответствующие формы. Пессарии затвердевают при охлаждении. Чтобы обеспечить процесс затвердевания, вводят такие вспомогательные вещества, как твердый жир, макроголы, масло какао, разные гелеобразующие смеси, которые содержат, например, желатин, воду и глицерин.

Проводят испытание для подтверждения соответствующего высвобождения действующего вещества или веществ из пессариев, предназначенных для пролонгированного местного действия.

Проводят определение устойчивости пессариев к разрушению *(2.9.24),* если нет других указаний в частной статье.

ИСПЫТАНИЯ

Распадаемость. Если пессарии не предназначены для местного пролонгированного действия, они должны выдерживать испытание на распадаемость суппозиториев и пессариев *(2.9.2)*. Состояние пессариев исследуют через 60 мин, если нет других указаний в частной статье.

Вагинальные таблетки

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Вагинальные таблетки – твердые однодозовые лекарственные средства, в общем сходные с таблетками без оболочки или таблетками, покрытыми оболочкой, по определению, приведенному в статье *«Таблетки»*.

ПРОИЗВОДСТВО

Проводят испытание для подтверждения соответствующего высвобождения действующего вещества или веществ из вагинальных таблеток, предназначенных для пролонгированного местного действия.

ИСПЫТАНИЯ

Распадаемость. Если вагинальные таблетки не предназначены для местного пролонгированного действия, они должны выдерживать испытание на распадаемость суппозиториев и пессариев (специальный метод для вагинальных таблеток, *2.9.2*). Состояние таблеток исследуют через 30 мин, если нет других указаний в частной статье.

Вагинальные капсулы

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Вагинальные капсулы (пессарии с оболочкой) – твердые однодозовые лекарственные средства, в общем сходные с мягкими капсулами, отличающиеся только формой и размером. Вагинальные капсулы могут иметь различную форму, обычно яйцевидную. Они должны быть гладкими и однородными по внешнему виду.

ПРОИЗВОДСТВО

Проводят испытание для подтверждения соответствующего высвобождения действующего вещества или веществ из вагинальных капсул, предназначенных для местного пролонгированного действия.

ИСПЫТАНИЯ

Распадаемость. Если вагинальные капсулы не предназначены для местного пролонгированного действия, они должны выдерживать испытание на распадаемость суппозиториев и пессариев *(2.9.2).* Состояние капсул исследуют через 30 мин, если нет других указаний в частной статье.

Вагинальные растворы, эмульсии и суспензии

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Вагинальные растворы, эмульсии и суспензии – жидкие лекарственные средства, предназначенные для местного действия, орошения или для применения с диагностической целью. Они могут содержать вспомогательные вещества, например, для обеспечения необходимой вязкости, создания или стабилизации необходимого значения pH, повышения растворимости действующего вещества или веществ или обеспечения стабильности лекарственного средства. Вспомогательные вещества не должны отрицательно влиять на основное действие лекарственного средства или, в используемых концентрациях, не должны оказывать нежелательного местного раздражающего действия.

Вагинальные эмульсии могут расслаиваться, однако должны быстро восстанавливаться при взбалтывании.

Вагинальные суспензии могут образовывать осадок, который быстро ресуспендируется при взбалтывании, образуя суспензию достаточно стабильную, чтобы обеспечить однородность лекарственного средства при введении.

Вагинальные растворы, эмульсии и суспензии обычно выпускают в однодозовых контейнерах, которые приспособлены для введения лекарственного средства во влагалище или снабжены подходящей насадкой.

ПРОИЗВОДСТВО

При изготовлении вагинальных суспензий предусматривают меры, обеспечивающие необходимый размер частиц и его контроль, в зависимости от способа применения лекарственного средства.

Таблетки для приготовления вагинальных растворов или суспензий

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Таблетки для приготовления вагинальных растворов и суспензий – однодозовые лекарственные средства, которые растворяют или диспергируют в воде непосредственно перед применением. Они могут содержать вспомогательные вещества, которые способствуют растворению или диспергированию или предотвращают агрегацию частиц.

За исключением испытания на распадаемость таблетки для приготовления растворов или суспензий для влагалищного применения соответствуют определению, приведенному в статье *«Таблетки»*.

После растворения или диспергирования они должны выдерживать требования, которые предъявляют к вагинальным растворам или суспензиям соответственно.

ИСПЫТАНИЯ

Распадаемость. Таблетки для приготовления вагинальных растворов или суспензий должны распадаться в течение 3 мин, если испытание проводят в соответствии проводят по методике, описанной в статье *«Распадаемость таблеток и капсул» (2.9.1),* используя в качестве жидкой среды *воду Р* при температуре от 15^0С до 25^0С.

МАРКИРОВКА

На этикетке указывают:

- способ приготовления вагинальных растворов или суспензий;
- условия и срок хранения раствора или суспензии после приготовления.

Мягкие лекарственные средства для вагинального применения

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

К мягким лекарственным средствам для вагинального применения относятся мази, крема или гели.

Они обычно представляют собой однодозовые лекарственные средства в контейнерах, снабженных подходящей насадкой.

Мягкие лекарственные средства для вагинального применения должны выдерживать требования статьи *«Мягкие лекарственные средства для местного применения».*

Вагинальные пены

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Вагинальные пены должны соответствовать требованиям статьи *«Пены медицинские».*

Вагинальные тампоны

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Вагинальные тампоны – твердые однодозовые лекарственные средства, предназначенные для введения во влагалище на определенное время.

Они должны соответствовать требованиям статьи *«Тампоны медицинские».*

ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА ДЛЯ ИНГАЛЯЦИЙ

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Лекарственные средства для ингаляций – жидкие или твердые лекарственные средства в виде паров или аэрозолей, предназначенные для получения местного или системного эффекта при поступлении в дыхательные пути. Лекарственные средства для ингаляции содержат одно или более действующих веществ, которые растворяют или диспергируют в соответствующем носителе.

Лекарственные средства для ингаляций, в зависимости от типа лекарственного средства, содержат пропелленты, вспомогательные растворители, разбавители, антимикробные консерванты, солюбилизирующие и стабилизирующие агенты и др. Эти наполнители не должны оказывать неблагоприятное воздействие на функции слизистой дыхательных путей и ее ресничек.

Лекарственные средства для ингаляций выпускают в многодозовых или однодозовых контейнерах. Лекарственные средства для ингаляций, выпускаемые в контейнерах под давлением, должны соответствовать требованиям статьи «*Лекарственные средства, находящиеся под давлением».*

Лекарственные средства для ингаляций в виде аэрозолей (дисперсии твердых или жидких частиц в газовой среде), применяют при помощи одного из специального приспособления:

- распылителя;
- дозированного ингалятора, находящегося под давлением;
- сухо-порошкового ингалятора.

ПРОИЗВОДСТВО

При разработке лекарственных средств для ингаляций, в состав которых входят антимикробные консерванты, уполномоченному органу представляют данные, подтверждающие эффективность выбранных консервантов. Метод определения и критерии оценки эффективности консервантов должны соответствовать требованиям статьи *«Эффективность антимикробных консервантов» (5.1.3).*

Значительная часть частиц аэрозоля, который вдыхают, оседает в легком, поэтому необходимо контролировать их размер. Характеристики мелких частиц в лекарственных средствах для ингаляций определяют методом, указанным в статье *«Аэродинамические испытания мелких частиц» (2.9.18).*

При оценке однородности высвобождаемой дозы из многодозового ингалятора оценивают однородность дозы при одном нажатии в начале, середине и конце нажатия количества доз, указанных на маркировке ингалятора.

Дозированные ингаляторы, находящиеся под давлением, испытывают на герметичность. Все ингаляторы испытывают на загрязнение посторонними примесями по методике, приведенной в частной статье.

ИСПЫТАНИЯ

\# **Проверка упаковки на герметичность**. Контейнер без колпачка и распылителя и насадки полностью погружают в водяную баню при температуре 45 ± 5^0C не менее чем на 15 мин и не более чем на 30 мин для стеклянного контейнера и не менее чем на 10 мин и не более чем на 20 мин для металлического контейнера. Толщина слоя воды над штоком клапана должна быть не менее 1 см. Не должно наблюдаться выделение пузырьков газа.

МАРКИРОВКА

На этикетке дозированных ингаляторов должно быть указано:

- доза, за исключением лекарственных средств, для которых доза отмерена;
- количество нажатий на ингалятор для получения минимальной рекомендованной дозы;
- число доз в ингаляторе.

На этикетке также указывают названия всех входящих в состав лекарственного средства антимикробных консервантов.

Жидкие лекарственные средства для ингаляций

Различают три категории жидких лекарственных средств для ингаляций:

A. Лекарственные средства, которые переводятся в парообразное состояние.

B. Жидкие лекарственные средства для распыления.

C. Дозированные лекарственные средства для ингаляций, находящиеся под давлением.

Жидкие лекарственные средства для ингаляций представляют собой растворы или дисперсии.

Дисперсии применяют после встряхивания и они достаточно устойчивы, чтобы гарантировать однородность дозирования. В их состав могут входить вспомогательные вещества.

A. ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА, КОТОРЫЕ ПЕРЕВОДЯТСЯ В ПАРООБРАЗНОЕ СОСТОЯНИЕ

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Лекарственные средства, которые переводятся в парообразное состояние, представляют собой растворы, дисперсии или твердые лекарственные средства. Обычно в них добавляют горячую воду и образующийся пар вдыхают.

B. ЖИДКИЕ ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА ДЛЯ РАСПЫЛЕНИЯ

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Жидкие лекарственные средства для распыления преобразуются в аэрозоли при помощи распылителей или дозированных распылителей для растворов, суспензий и эмульсий. Для усиления растворимости действующих веществ используют вспомогательные растворители или солюбилизаторы.

Жидкие лекарственные средства в распылителях непрерывного действия представляют собой концентрат, который растворяют в предписанном объеме указанной жидкости перед применением. Жидкие лекарственные средства для распыления могут также быть приготовлены из порошков.

pH жидких лекарственных средств в распылителях непрерывного действия должно быть не менее 3 и не более 8,5.

Суспензии и эмульсии быстро восстанавливаются при встряхивании и остаются достаточно стабильными, чтобы обеспечить однородность дозирования.

Водные лекарственные средства для распыления, которые выпускают в многодозовых контейнерах, могут содержать антимикробные консерванты, за исключением лекарственных средств, которые сами обладают антимикробными свойствами.

Распылители непрерывного действия представляет собой приспособления, преобразующие жидкости в аэрозоли, оказывая давление на газы при помощи

ультразвука или под другим воздействием. Они позволяют вдыхать необходимую дозу лекарственного средства с определенной скоростью. При этом образуются частицы определенного размера, что позволяет распределяться лекарственному средству в легких.

Дозированные распылители представляют собой приспособления, которые под высоким давлением или в результате ультразвука превращают жидкости в аэрозоли. Объем жидкости в распылителе отмеряется таким образом, чтобы при вдохе доза аэрозоля полностью попадала в дыхательные пути.

C. ДОЗИРОВАННЫЕ ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА ДЛЯ ИНГАЛЯЦИЙ, НАХОДЯЩИЕСЯ ПОД ДАВЛЕНИЕМ

Дозированные лекарственные средства для ингаляций, находящиеся под давлением, представляют собой растворы, суспензии или эмульсии, которые выпускают в специальных контейнерах, снабженных дозировочным клапаном, и которые находятся под давлением с подходящими пропеллентами или подходящими смесями растворенных пропеллентов, которые могут выступать в роли растворителей. В состав этих лекарственных средств могут входить вспомогательные растворители, солюбилизаторы и стабилизаторы.

Высвобожденная доза для некоторых лекарственных средств отмеривается дозатором, также дозу вводят непосредственно с помощью ингалятора.

ИСПЫТАНИЯ

Однородность высвобождаемой дозы. Контейнеры, как правило, используют в перевернутом виде. Для контейнеров, которые применяются вертикально, используют методы испытания, позволяющие определять высвобожденную дозу. В любом случае ингалятором пользуются в соответствии с описанием в инструкции по применению.

Аппарат для сбора дозы предназначен для количественного измерения дозы. С этой целью могут быть использованы следующие аппараты и методики.

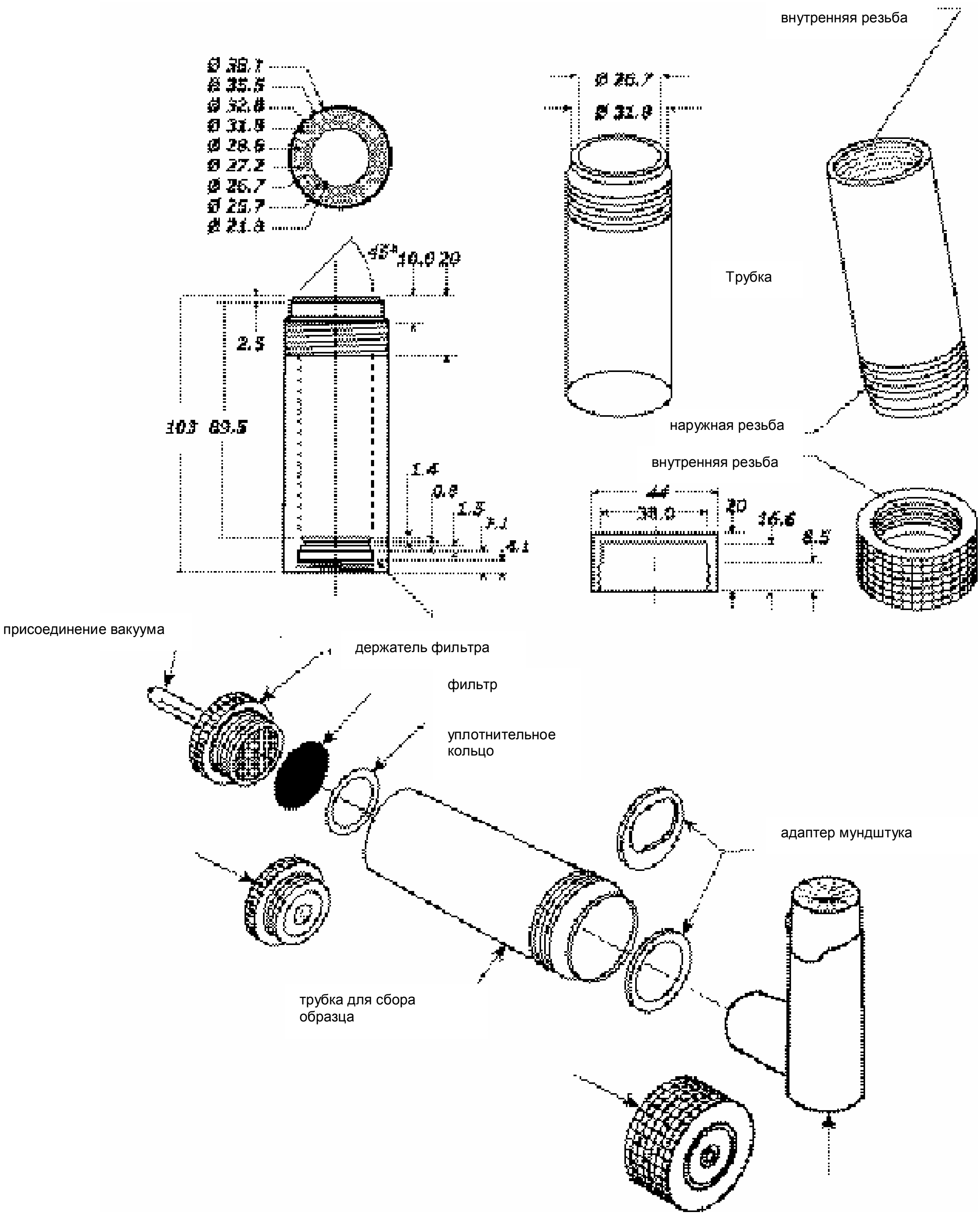


Рисунок 0671.-1. – Аппарат для сбора дозы в дозированных лекарственных средствах, находящихся под давлением.
Размеры указаны в миллиметрах

Аппарат (Рисунок 0671.-1) состоит из держателя фильтра в виде стального экрана. В состав входит собирающая трубка, которая прижата или прикручена к держателю фильтра, и адаптер, который герметично соединяет собирающую трубку

и выходное отверстие. Вакуумный ниппель соединяет систему, включающую источник вакуума и регулятор потока. Источник должен быть отрегулирован таким образом, чтобы воздух проходил через всю конструкцию, включая фильтр и ингалятор, со скоростью 28,3±1,5 л/мин. Воздух быстро проходит через аппарат. Это позволяет избежать потери действующего вещества. Фильтр и другие составляющие части конструкции должны быть совместимы с действующим веществом и растворителями, которые используются для извлечения действующего вещества из фильтра. Один конец соединительной трубки сделан таким образом, чтобы поддерживать диск напротив держателя фильтра. В собранном виде соединения компонентов аппарата герметичны. Поэтому при воздействии вакуума на держатель фильтра, весь воздух проходит через собирательную трубку ингалятора.

Если нет особых указаний в инструкции по применению, перед использованием ингалятор встряхивают в течение 5 с и сбрасывают одну дозу. Вставляют ингалятор в аппарат, отжимают клапан на некоторое время, чтобы выпустить порцию лекарственного средства. Повторяют процедуру несколько раз. Измеряют количество действующего вещества в собранной порции. Процедуру повторяют дважды.

Несколько доз сбрасывают, с интервалом не менее 5 с. Когда остается (n/2)+1 доз, где n – количество доз, указанных на этикетке, собирают 4 дозы по описанной выше методике.

Опять сбрасывают несколько доз, с интервалами не менее 5 с, пока не останется 3 дозы. Собирают три последние дозы по описанной выше методике. Для лекарственных средств, содержащих более одного действующего вещества, испытание на однородность высвобождаемой дозы выполняют для каждого.

Лекарственное средство выдерживает испытание, если 9 из 10 результатов находятся в пределах от 75% до 125% среднего значения, а все результаты находятся в пределах от 65% до 135%. Если 2 или 3 результата выпадают из пределов 75% - 125%, испытание повторяют с использование двух других ингаляторов. Не более 3 их 30 значений должны выходить за пределы 75% - 125% и все значения должны быть в пределах 65%-135%.

Размер частиц. Используют аппарат и методику, описанную в статье *«Аэродинамические испытания мелких частиц» (2.9.18 – аппарат C или D).*

Число доз в ингаляторе. Берут один ингалятор и выпускают его содержимое. Клапан нажимают с интервалом не менее 5 с. Полученное количество доз должно быть не меньше значения, указанного на этикетке (это испытание можно выполнять одновременно с определением однородности высвобождаемой дозы).

Порошки для ингаляций

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Порошки для ингаляций содержат одну или несколько доз порошка. Для более эффективного их использования, действующие вещества могут быть в смеси с носителями. Как правило, порошки вводят с помощью порошковых ингаляторов. В системах, имеющих дозаторы, порошок используется в капсулах или в других удобных дозированных формах. В приспособлениях, содержащих резервуар для порошка, доза лекарственного средства отмеряется автоматически.

ИСПЫТАНИЯ

Однородность высвобождаемой дозы. Ингалятор используют, как описано в инструкции по применению. Аппарат для сбора дозы позволяет автоматически отмерять количество лекарственного средства. Аппарат для сбора дозы аналогичен тому, который описан для дозированных аэрозолей, находящихся под давлением.

Размеры его фильтра и соединительной трубки должны соответствовать скорости потока. Образец трубки представлен на рисунке 0671.-2 и в таблице 0671.-1.

Если нет других указаний в частной статье, следует определить скорость потока и продолжительность с помощью собирательной трубки.

Ингалятор готовят, как указано в инструкции по применению и соединяют его с аппаратом при помощи адаптера, убедившись в герметичности соединения. Лицевую сторону адаптера совмещают с лицевой поверхностью собирательной трубки. Соединяют одно отверстие манометра со шкалой давления, P1 (Рисунок 0671.-2), а второе оставляют открытым. Включают насос, открывают клапан. С помощью контрольного клапана устанавливается давление ингалятора на уровне 4,0 кПА (40,8 см H_2O). Отсоединяют ингалятор от адаптера мундштука и, не нажимая контрольный клапан, присоединяют измеритель расхода к выходному отверстию аппарата. Если скорость потока составляет более 100 л/мин, с помощью контрольного клапана регулируют этот показатель в пределах 100±5 л/мин. Замечают объемную скорость потока воздуха (тестируемая скорость потока, Q, л/мин). Замеряют продолжительность потока (T, сек.) – время, в течение которого 4 л воздуха проходят через ингалятор.

Следует проверить скорость потока. При скорости потока, Q, измеряют абсолютное давление с обеих сторон контрольного клапана (точки замера давления P2 и P3 представлены на рисунке 0671.-2). Если отношение P2/P3 ≤ 0,5 – это критическая скорость потока. При этом следует переключиться на более сильный насос и повторить измерение скорости потока.

Системы предварительного диспергирования. Ингалятор готовят, как указано в инструкции по применению, и присоединяют к аппарату, используя адаптер для герметичного соединения. Пропускают воздух через ингалятор. Повторяют процедуру до тех пор, пока выделяется минимальное рекомендуемое количество лекарственного средства. Собирают содержимое и определяют количество действующего вещества.

Процедуру повторяют 9 раз.

Резервуар. Ингалятор готовят, как указано в инструкции по применению, и присоединяют к аппарату, используя адаптер для герметичного соединения. Пропускают воздух через ингалятор. Повторяют процедуру до тех пор, пока выделяется минимальное рекомендуемое количество лекарственного средства. Собирают содержимое и определяют количество действующего вещества.

Процедуру повторяют 2 раза.

Опорожняют приспособление до тех пор, пока не останется (n/2)+1 доз (n – число доз, указанных на этикетке). Собирают 4 дозы, используя описанную методику.

Опорожняют приспособление до тех пор, пока не останется 3 дозы. Собирают 3 дозы, используя описанную методику.

Для лекарственных средств, содержащих более одного действующего вещества, выполняют испытание на однородность высвобождаемой дозы для каждого действующего вещества.

Лекарственное средство выдерживает испытание, если 9 из 10 результатов находятся в пределах от 75% до 125% среднего значения, а все результаты находятся в пределах от 65% до 135%. Если 2 или 3 результата выпадают из пределов 75% - 125%, испытание повторяют с использование двух других ингаляторов. Не более 3 их 30 значений должны выходить за пределы 75% - 125% и все значения должны быть в пределах 65%-135%.

В строго регламентированных случаях границы могут быть расширены, но не должны превышать 150% и быть менее 50% среднего значения.

Таблица 0671.-1

Спецификации аппарата, описанного на рисунке 0671.-2

Код	Приспособление	Описание
A	Трубка для собирания образца	Позволяет выполнять количественное определение дозы. Аналогична трубке, описанной на Рисунке 0671.-1 с размерами 34,85 мм (внутренний диаметр) × 12 см (длина) (например, продукт номер XX40 047 00, Millipore Corporation, Bedford, MA 01732 с модифицированной отводящей трубкой, внутренний диаметр ≥ 8 мм, снабженной продуктом Gelman номер 61631), или подобная трубка.
B	Фильтр	47 мм фильтр, например A/E стеклянный волокнистый фильтр (Gelman Sciences, Ann Arbor, MI 48106), или аналог.
C	Соединитель	Внутренний диаметр ≥ 8 мм, например, короткая металлическая муфта с короткой отводной трубкой к P3.
D	Вакуумная трубка	8 ± 0,5 мм (внутренний диаметр) × 50 ± 10 см (длина), например, силиконовая трубка с наружным диаметром - 14 мм и внутренним диаметром - 8 мм.
E	Двусторонний электромагнитный клапан	Горловина с минимальной резистентностью, с внутренним диаметром ≥ 8 мм и максимальным временем ответа 100 мс (например, тип 256-A08, Bürkert GmbH, D-74653 Ingelfingen), или аналог.
F	Вакуумный насос	Насос должен обеспечивать необходимую скорость потока в собранном аппарате с ингалятором для сухого порошка (например, продукт 1023, 1423 или 2565, Gast Manufacturing Inc., Benton Harbor, MI 49022), или аналог. Насос соединяют с двусторонним электромагнитным клапаном с помощью короткой и/или широкой вакуумной трубки (внутренний диаметр ≥ 10 мм).
G	Таймер	Таймер, способный погружаться в электромагнитный клапан в течение необходимого времени (например тип G814, RS Components International, Corby, NN17 9RS, UK), или аналог.
P1	Отвод к манометру	2,2 мм (внутренний диаметр), 3,1 мм (наружный диаметр), заполняет внутреннюю поверхность собирательной трубки.
P1 P2 P3	Измерители давления	Разница давления по сравнению с атмосферным (P1) или абсолютным давлением (P2 и P3).
H	Контрольный клапан	Регулирующий клапан с максимальным C*v* ≥ 1, (например, тип 8FV12LNSS, Parker Hannifin plc., Barnstaple, EX31 1NP, UK), или аналог.

Размер частиц. Используют аппарат и методику, описанную в статье *«Аэродинамические испытания мелких частиц» (2.9.18 – аппарат C или D).*

Число доз в ингаляторе. Берут один ингалятор и выпускают его содержимое с определенной скоростью потока. Отмечают полученное значение. Полученное количество доз должно быть не меньше значения, указанного на этикетке (это испытание можно выполнять одновременно с определением однородности высвобожденной дозы).

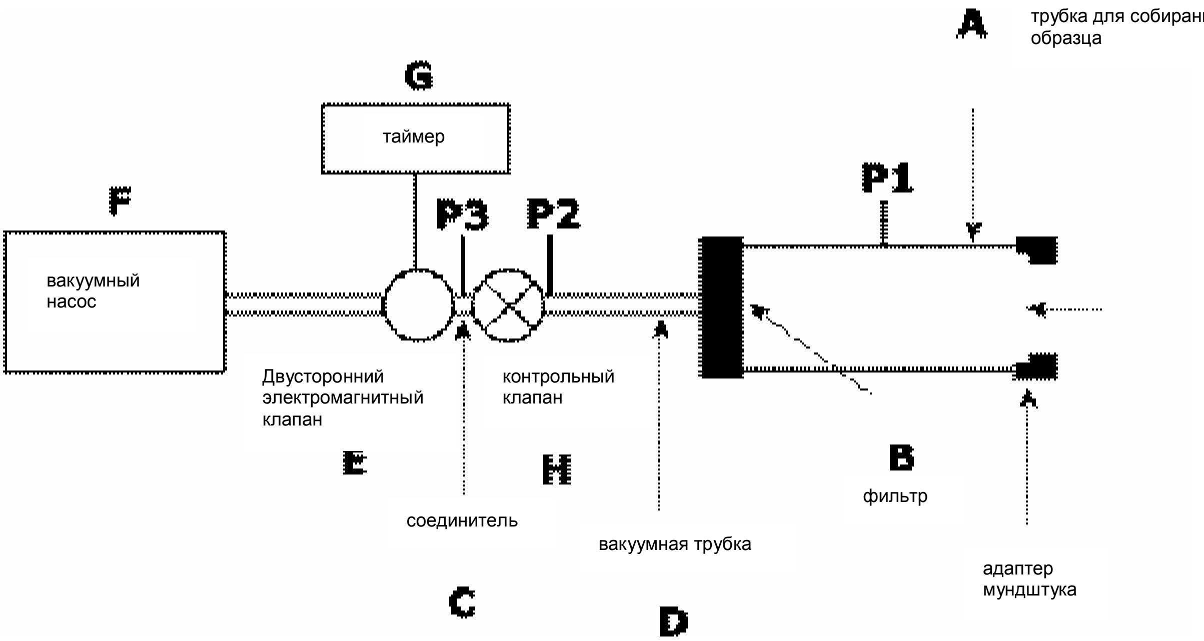


Рисунок 0671.-2. – Аппарат для определения однородности дозы в порошковых ингаляторах.

ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА, НАХОДЯЩИЕСЯ ПОД ДАВЛЕНИЕМ

К лекарственным средствам, находящимся под давлением, предъявляют дополнительные требования, указанные в других статьях, например, «Лекарственные средства для ингаляций», «Жидкие лекарственные средства для наружного применения», «Порошки для наружного применения», «Назальные лекарственные средства» и «Ушные лекарственные средства», если нет других указаний в частных статьях.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Лекарственные средства, находящиеся под давлением, - лекарственные средства, находящиеся в специальных контейнерах под давлением газа и содержащие одно или более действующих веществ. Данные лекарственные средства при выходе из контейнера при нажатии на клапан представляют собой аэрозоль (дисперсию твердых или жидких частиц в газе, размер которых зависит от назначения лекарственного средства), жидкость или мягкую пену. Давление, необходимое для выхода лекарственного средства из контейнера, обеспечивают соответствующие пропелленты. Лекарственные средства, находящиеся под давлением, представляют собой раствор, эмульсию или суспензию. Они предназначены для местного нанесения на кожу, на слизистые оболочки или ингаляции. В состав лекарственных средств могут входить такие вспомогательные

вещества, эмульгаторы, суспендирующие вещества, эмульгаторы, растворители, а также скользящие вещества, предотвращающие засорение клапана.

Пропелленты. Пропелленты представляют собой сжиженные под давлением газы, сжатые газы или низкокипящие жидкости. Сжиженными газами являются фторированные углеводороды и углеводороды с низкой молекулярной массой, такие как пропан или бутан. Сжатые газы – углерода диоксид, азот или азота закись.

Могут использовать смеси пропеллентов для получения лекарственного средства с оптимальными свойствами и заданными характеристиками давления, дозы и распыления.

Контейнеры. Контейнеры должны быть прочными и устойчивыми по отношению к внутреннему давлению. Они могут быть изготовлены из металла, стекла, пластика или комбинации этих материалов и не должны взаимодействовать с содержимым. Стеклянные контейнеры должны иметь защитное пластиковое покрытие.

Распыляющие устройства. Клапан должен герметично закрывать контейнер в нерабочем положении и обеспечивать необходимую дозу лекарственного средства в процессе использования. На характеристику распыления влияют размеры, количество и расположение отверстий, а также тип распыляющего устройства. Клапаны обеспечивают непрерывный выход (клапан непрерывного действия) или выдают отмеренное количество лекарственного средства при каждом нажатии (клапан дозирующего действия).

Материалы, используемые для производства клапанов, не должны взаимодействовать с содержимым контейнера.

Требования, предъявляемые к лекарственным средствам, находящимся под давлением. Лекарственные средства, находящиеся под давлением, должны быть оснащены соответствующим распыляющим устройством, согласно его назначению.

Лекарственные средства должны соответствовать требованиям, предъявляемым к пропеллентам, размеру частиц, дозе, получаемой при одном нажатии на дозирующий клапан.

МАРКИРОВКА:

На этикетке указывают:

- способ применения;
- меры предосторожности;
- для лекарственных средств, находящихся в контейнере с клапаном дозирующего действия, указывают количество действующего вещества в одной дозе.

ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА ДЛЯ ОРОШЕНИЯ

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Лекарственные средства для орошения - стерильные водные лекарственные средства большого объема, предназначенные для орошения пораженных участков тела, ран и поверхностей, например, во время хирургического вмешательства.

Лекарственными средствами для орошения являются или растворы, приготовленные растворением одного или более действующих веществ, электролитов или осмотически активных веществ в воде, которая соответствует требованиям статьи *«Вода для инъекций»* или лекарственные средства, состоящие только из такой воды. В последнем случае лекарственные средства должны быть промаркированы «вода для орошений». Обычно лекарственные средства для орошения должны быть изотоничными.

Лекарственные средства для орошения в подходящих условиях испытания должны быть прозрачными и практически свободными от частиц.

Лекарственные средства для орошения выпускают в однодозовых контейнерах. Контейнеры и укупорочные средства должны соответствовать требованиям, предъявляемым к контейнерам для лекарственных средств для парентерального применения *(3.2.1 и 3.2.2).* Однако приспособление к контейнеру для введения лекарственного средства не может быть совместимо с приспособлением для внутривенных инъекций и не может позволять использование лекарственных средств для орошения для внутривенных инъекций.

ПРОИЗВОДСТВО

Лекарственные средства для орошения производят с использованием материалов и методов, обеспечивающих их стерильность и исключающих возможность их последующего загрязнения и развитие микроорганизмов в соответствии с требованиями статьи «*Методы приготовления стерильных продуктов*» *(5.1.1)*.

ИСПЫТАНИЯ

Определение массы или объема содержимого контейнера *(2.9.28).* Лекарственные средства для орошения, выпускаемые в однодозовых контейнерах, должны выдерживать испытание на массу или объем содержимого контейнера.

Стерильность *(2.6.1).* Лекарственные средства для орошений должны выдерживать испытание на стерильность.

Бактериальные эндотоксины *(2.6.14).* Не более 0,5 IU в 1 мл.

Пирогены *(2.6.8).* Лекарственные средства для орошения, для которых невозможно провести валидационные испытания на бактериальные эндотоксины, должны выдерживать испытание на пирогены. Если нет других указаний в частной статье, вводят на 1 кг массы кролика 10 мл лекарственного средства.

МАРКИРОВКА

На этикетке указывают:

- лекарственное средство не может быть использовано для инъекций;
- лекарственное средство должно быть использовано за один раз, а любая неиспользованная часть должна быть уничтожена.

ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА ДЛЯ ПАРЕНТЕРАЛЬНОГО ПРИМЕНЕНИЯ

Требования данной статьи не распространяются на лекарственные средства, изготовленные из человеческой крови, иммунологические лекарственные средства или радиофармацевтические лекарственные средства.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Лекарственные средства для парентерального применения - стерильные лекарственные средства, предназначенные для введения путём инъекций, инфузий или имплантаций в организм человека или животного. Для приготовления лекарственных средств для парентерального применения используют вспомогательные вещества, например, обеспечивающие изотоничность лекарственных средств относительно крови, регулирующие pH, улучшающие растворимость действующих веществ, предотвращающие их разложения,

обеспечивающие соответствующие антимикробные свойства. Эти вещества не должны отрицательно влиять на основное действие лекарственного средства или, в используемых концентрациях, не должны вызывать токсичность или нежелательное местное раздражающее действие.

Контейнеры для лекарственных средств для парентерального применения должны быть изготовлены из материалов, которые достаточно прозрачны и позволяют визуально просмотреть содержимое контейнера, за исключением имплантантов, если нет других указаний в частной статье.

Контейнеры для лекарственных средств для парентерального применения, должны соответствовать требованиям статей *«Материалы, используемые для производства контейнеров» (3.1 и подразделы)* и *«Контейнеры» (3.2 и подразделы),* если нет других указаний в частной статье.

Лекарственные средства для парентерального применения выпускают в стеклянных контейнерах *(3.2.1)* или в других, таких как пластмассовые контейнеры *(3.2.2, 3.2.2.1* и *3.2.9)* и предварительно наполненные шприцы. Герметичность контейнера обеспечивают соответствующими способами. Укупорочные средства должны обеспечивать надежную изоляцию, предотвращать доступ микроорганизмов и других загрязнений и обычно позволяют извлекать часть или всё содержимое контейнера без удаления укупорочного средства. Пластиковые материалы или эластомеры *(3.2.9)*, из которых изготавливают укупорочные средства, должны быть достаточно прочными и эластичными, чтобы при прохождении иглы выделялось наименьшее количество частиц. Укупорочные средства контейнеров, содержащих несколько доз лекарственного средства, должны быть достаточно эластичными, чтобы обеспечивать герметизацию контейнера при извлечении иглы.

Лекарственные средства для парентерального применения можно классифицировать как:

- инъекции;
- инфузии;
- концентраты для приготовления инъекций и инфузий;
- порошки для приготовления инъекций и инфузий;
- имплантаты;
- # салфетки.

ПРОИЗВОДСТВО

При разработке лекарственных средств для парентерального применения, в состав которых входят антимикробные консерванты, уполномоченному органу представляют данные, подтверждающие эффективность выбранных консервантов. Метод определения и критерии оценки эффективности консервантов должны соответствовать требованиям статьи *«Эффективность антимикробных консервантов» (5.1.3).*

Лекарственные средства для парентерального применения изготавливают с использованием материалов и методов, обеспечивающих стерильность и предотвращающих загрязнение лекарственных средств и развитие микроорганизмов в соответствии с требованиями статьи *«Методы приготовления стерильных продуктов» (5.1.1).*

Вода, используемая при производстве лекарственных средств для парентерального применения, должна соответствовать требованиям, указанным в статье «*Вода для инъекций*».

ИСПЫТАНИЯ

Загрязнение механическими включениями: невидимые частицы (*2.9.19*). Лекарственные средства, предназначенные для введения в организм человека,

растворы для инфузий и инъекционные растворы, выпускаемые в контейнерах с номинальным объемом более 100 мл, должны выдерживать данное испытание.

Лекарственные средства, предназначенные для использования в ветеринарии, растворы для инфузий и инъекционные растворы, выпускаемые в контейнерах с номинальным объемом более 100 мл и, если содержимое контейнера эквивалентно дозе более чем 1,4 мл на килограмм массы тела, должны выдерживать испытание на загрязнение механическими включениями: невидимые частицы *(2.9.19).*

Данные требования не распространяются на лекарственное средство, на маркировке которого указано, что он используется с фильтром.

Стерильность *(2.6.1)*. Лекарственные средства для парентерального применения должны выдерживать испытание на стерильность.

ХРАНЕНИЕ

Хранить в стерильном, воздухонепроницаемом, неповреждённом контейнере, если нет других указаний в частной статье.

МАРКИРОВКА

На этикетке указывают:

- название и концентрацию всех добавленных антимикробных консервантов;
- если необходимо, использование фильтра для раствора;
- если необходимо, «свободно от эндотоксинов» или «апирогенно».

Инъекционные лекарственные средства

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Инъекционные лекарственные средства - стерильные растворы, эмульсии или суспензии. Их готовят путём растворения, эмульгирования или суспендирования действующего вещества или веществ и вспомогательных веществ в *воде для инъекций Р*, или в подходящей стерильной неводной жидкости, или в смеси этих растворителей.

Растворы для инъекций в соответствующих условиях наблюдения должны быть прозрачными и практически свободными от частиц.

Эмульсии для инъекций не должны обнаруживать признаков расслоения. В суспензиях для инъекций может наблюдаться осадок, который должен быстро диспергироваться при взбалтывании, образуя суспензию, достаточно стабильную, чтобы обеспечить необходимую дозу при введении.

Многодозовые лекарственные средства. Многодозовые водные инъекционные лекарственные средства содержат соответствующий антимикробный консервант в необходимой концентрации, за исключением лекарственных средств, обладающих соответствующими противомикробными свойствами. При выпуске лекарственного средства для парентерального применения в многодозовом контейнере необходимо указывать меры предосторожности по его введению и, особенно, по хранению между отбором доз.

Антимикробные консерванты. Водные лекарственные средства, которые готовят в асептических условиях и которые не могут быть подвергнуты термической стерилизации, должны содержать подходящий антимикробный консервант в соответствующей концентрации.

Антимикробные консерванты не применяют, если:

- объём, вводимый в одноразовой дозе, превышает 15 мл, кроме случаев, где это доказано и утверждено;

- лекарственное средство по медицинскому применению предназначено для внутриполостных инъекций, эпидурально или другим способом, имеющим доступ к спинномозговой жидкости, или интра- или ретробульбарно.

Такие лекарственные средства выпускают в однодозовых контейнерах.

ПРОИЗВОДСТВО

При производстве инъекционных лекарственных средств, содержащих дисперсные частицы, предпринимают меры, обеспечивающие необходимый размер частиц и его контроль.

Однодозовые лекарственные средства. Объём инъекционного лекарственного средства в однодозовом контейнере должен быть достаточен для отбора и введения номинальной дозы при использовании обычного способа введения.

ИСПЫТАНИЯ

Однородность содержания *(2.9.6)*. Однодозовые суспензии для инъекций с содержанием действующего вещества менее 2 мг или менее 2 % от общей массы содержимого должны выдерживать испытание на однородность содержания действующего вещества в единице дозированного лекарственного средства (тест А), если нет других указаний в частной статье. Если лекарственное средство содержит более одного действующего вещества, это требование распространяется только на те вещества, содержание которых соответствуют выше указанным условиям.

Бактериальные эндотоксины - пирогены. Инъекционные лекарственные средства должны выдерживать испытание на бактериальные эндотоксины *(2.6.14)* или, если указано в частных статьях, испытание на пирогены *(2.6.8)*. Рекомендации по предельно допустимым нормам содержания бактериальных эндотоксинов приведены в статье *2.6.14*.

Лекарственные средства для человека. Лекарственные средства должны выдерживать испытание на бактериальные эндотоксины *(2.6.14)* или испытание на пирогены *(2.6.8).*

Лекарственные средства для животных. Если объём инъекционного лекарственного средства в одной дозы составляет 15 мл или более и эквивалентен дозе 0,2 мл или более на килограмм массы тела, лекарственное средство должно выдерживать испытание на бактериальные эндотоксины *(2.6.14)* или испытание на пирогены *(2.6.8)*.

Другие лекарственные средства. Если на этикетке указано, что лекарственное средство не содержит бактериальных эндотоксинов или апирогенно, лекарственное средство должно выдерживать испытание на бактериальные эндотоксины (*2.6.14*) или испытание на пирогены (*2.6.8*) соответственно.

Пирогенны *(2.6.8)*. Если объем инъекционного лекарственного средства в одной дозе составляет 15 мл или более и испытание на бактериальные эндотоксины не указано в частной статье, лекарственное средство должно выдерживать испытание на пирогены. Если объем инъекционного лекарственного средства в одной дозе составляет менее 15 мл и на этикетке указано, что лекарственное средство апирогено, и испытание на бактериальные эндотоксины не описано или невозможно, лекарственное средство должно выдерживать испытание на пирогены.

Инфузии

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Инфузии - стерильные водные растворы или эмульсии с водой в качестве дисперсионной среды; обычно изотоничны с кровью. Они преимущественно предназначаются для применения в объёме более 100 мл. Инфузии не содержат

антимикробных консервантов.

Растворы для инфузий оценивают в соответствующих условиях наблюдения, при этом они должны быть прозрачными и практически свободными от частиц.

Эмульсии для инфузий не должны обнаруживать признаков расслоения.

ПРОИЗВОДСТВО

При производстве инфузий, содержащих дисперсные частицы, предпринимают меры, обеспечивающие необходимый размер частиц и его контроль.

Объём инфузий в однодозовом контейнере должен быть достаточен для отбора и введения номинальной дозы при использовании обычного способа введения.

ИСПЫТАНИЯ

Бактериальные эндотоксины - пирогены. Инфузии должны выдерживать испытание на бактериальные эндотоксины *(2.6.14)* или, если указано в частных статьях, испытание на пирогены *(2.6.8)*.

При проведении испытания на пирогены вводят 10 мл лекарственного средства на килограмм веса кролика, если нет других указаний в частной статье.

Концентраты для приготовления инъекционных лекарственных средств или инфузий

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Концентраты для приготовления инъекционных лекарственных средств или инфузий представляют собой стерильные растворы, предназначенные для инъекций или инфузий после разведения. Концентраты разводят до указанного объёма соответствующей жидкостью перед применением. После разведения полученный раствор должен соответствовать требованиям, предъявляемым к инъекционным лекарственным средствам или инфузиям.

ИСПЫТАНИЯ

Бактериальные эндотоксины - пирогены. Лекарственное средство должно выдерживать требования, предъявляемые к инъекционным лекарственным средствам или инфузиям соответственно, после разведения до определенного объёма.

Порошки для приготовления инъекционных лекарственных средств и инфузий

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Порошки для приготовления инъекционных лекарственных средств или инфузий - твёрдые стерильные вещества, помещенные в контейнеры, которые при встряхивании с указанным объёмом соответствующей стерильной жидкости быстро образуют или прозрачный, свободный от частиц раствор, или однородную суспензию. После растворения или суспендирования они должны соответствовать требованиям, предъявляемым к лекарственным средствам для инъекций или инфузий соответственно.

Лиофилизированные лекарственные средства для парентерального применения рассматривают как порошки для приготовления инъекционных лекарственных средств или инфузий.

ПРОИЗВОДСТВО

Однородность содержания и однородность массы лиофилизированных лекарственных средств для парентерального применения обеспечивают в ходе

внутрипроизводственного контроля за количеством раствора перед лиофилизацией.

ИСПЫТАНИЯ

Однородность содержания *(2.9.6)*. Порошки для приготовления инъекционных растворов и инфузий с содержанием действующего вещества менее 2 мг или менее 2 % от общей массы содержимого, или с массой дозированной единицы равной 40 мг или менее должны выдерживать испытание на однородность содержания действующего вещества в единице дозированного лекарственного средства (тест А), если нет других указаний в частной статье. Если лекарственное средство содержит более одного действующего вещества, это требование распространяется только на те вещества, содержание которых соответствуют выше указанным условиям.

Однородность массы *(2.9.5).* Порошки для приготовления инъекционных растворов и инфузий должны выдерживать испытание на однородность массы для единицы дозированного лекарственного средства. Испытание на однородность массы не требуется, если испытание на однородность содержания предусмотрено для всех действующих веществ

Бактериальные эндотоксины - пирогены. Лекарственное средство должно выдерживать требования, предъявляемые к инъекционным лекарственным средствам или инфузиям соответственно, после разведения или суспендирования до определенного объёма жидкости.

МАРКИРОВКА

На этикетке указывают способ приготовления лекарственного средства для инъекций и инфузий.

Имплантаты

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Имплантаты представляют собой стерильные твёрдые лекарственные средства, имеющие подходящие для парентеральной имплантации размеры и форму и высвобождение действующего вещества или веществ в течение длительного периода времени. Они упакованы в индивидуальные стерильные контейнеры.

 # Салфетки

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Салфетки – стерильная лекарственная форма, имеющая фиксированные геометрические размеры, предназначенная для наружного и имплантационного применения.

ПРОИЗВОДСТВО

Салфетки получают путем сорбции лекарственных веществ на полотне. Стерилизация салфеток осуществляется g -лучами, что должно быть указано в частной статье.

ИСПЫТАНИЯ

Стерильность (2.6.1.). Салфетки должны выдерживать тест на стерильность.

ХРАНЕНИЕ

Хранят в стерильном, воздухонепроницаемом, неповрежденном контейнере, если нет других указаний в частной статье.

ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА ДЛЯ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ПОЛОСТИ РТА

Требования данной статьи не распространяются на лекарственные средства для стоматологии, таблетки для разжёвывания, жевательные резинки лекарственные, оральные лиофилизаты и другие твёрдые или мягкие лекарственные средства, предназначенные для разжёвывания или диспергирования в слюне перед глотанием. Эти требования не применимы к лекарственным средствам, используемым в ветеринарии, если нет других указаний в частных статьях.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Лекарственные средства для слизистой оболочки полости рта - твёрдые, мягкие или жидкие лекарственные средства, содержащие одно или более действующих веществ, и предназначены для введения в полость рта и/или горло для получения местного или системного эффекта. Лекарственные средства, предназначенные для получения местного эффекта, могут применяться путем нанесения на определённую область внутри полости рта, например, на десну (лекарственные средства для дёсен) или горла (орофарингиальные лекарственные средства). Лекарственные средства, предназначенные для получения системного эффекта, применяют для всасывания в одной или нескольких областях слизистой оболочки полости рта (например, подъязычные лекарственные средства). Слизистые адгезивные лекарственные средства предназначены для удержания в полости рта путём адгезии к эпителию слизистой оболочки и могут изменять системную абсорбцию лекарственного средства в месте применения. Для многих лекарственных средств для слизистой оболочки полости рта существует вероятность того, что некоторое количество действующего вещества или веществ будет проглатываться и абсорбироваться желудочно-кишечным трактом.

Лекарственные средства для слизистой оболочки полости рта могут содержать соответствующие противомикробные консерванты и другие вспомогательные вещества, такие как диспергирующие, суспендирующие вещества, загустители, эмульгаторы, буферы, смачивающие агенты, солюбилизаторы, стабилизаторы, ароматизаторы и подсластители. Твёрдые лекарственные средства дополнительно могут содержать вещества для скольжения и смазки, а также наполнители, способные влиять на высвобождение действующего вещества или веществ.

Контейнеры для лекарственных средств для слизистой оболочки полости рта должны соответствовать требованиям статей *«Материалы, используемые для производства контейнеров» (3.1 и подразделы) и «Контейнеры» (3.2 и подразделы),* если нет других указаний в частной статье.

Лекарственные средства для слизистой оболочки полости рта можно классифицировать как:

- растворы для полоскания горла;
- растворы для полоскания полости рта;
- растворы для дёсен;
- растворы и суспензии для слизистой оболочки полости рта;
- мягкие лекарственные средства для слизистой оболочки полости рта (включая, например, гель для дёсен, пасту для дёсен, гель и пасту для слизистой оболочки полости рта);
- капли для слизистой оболочки полости рта, спреи для слизистой оболочки полости рта и сублингвальные спреи (включая орофарингиальные спреи);
- леденцы и пастилки;
- прессованные леденцы;

- сублингвальные таблетки и таблетки для медленного растворения в щечном кармане;
- капсулы для слизистой оболочки полости рта;
- слизистые адгезивные лекарственные средства.

ПРОИЗВОДСТВО

При разработке лекарственных средств для слизистой оболочки полости рта, в состав которых входят антимикробные консерванты, уполномоченному органу представляют данные, подтверждающие эффективность выбранных консервантов. Метод определения и критерии оценки эффективности консервантов должны соответствовать требованиям статьи *«Эффективность антимикробных консервантов» (5.1.3).*

При производстве, упаковке, хранении и реализации лекарственных средств для слизистой оболочки полости рта предпринимают меры, обеспечивающие микробиологическую чистоту в соответствии с требованиями статьи *«Микробиологическая чистота лекарственных средств» (5.1.4).*

При производстве твердых и мягких лекарственных средств для слизистой оболочки полости рта, содержащих диспергированные частицы, предпринимают меры, обеспечивающие необходимый размер частиц и его контроль.

ИСПЫТАНИЯ

Однородность содержания *(2.9.6)*. Лекарственные средства в однодозовых контейнерах с содержанием действующего вещества менее 2 мг или менее 2% от общей массы содержимого должны выдерживать испытание на однородность содержания действующего вещества в единице дозированного лекарственного средства (тест А – прессованные и отлитые лекарственные средства; тест В – капсулы), если нет других указаний в частной статье. Если лекарственное средство содержит более одного действующего вещества, это требование распространяется только на те вещества, содержание которых соответствуют выше указанным условиям.

Однородность массы *(2.9.5).* Твердые лекарственные средства в однодозовых контейнерах должны выдерживать испытание на однородность массы для единицы дозированного лекарственного средства. Испытание на однородность массы не требуется, если испытание на однородность содержания предусмотрено для всех действующих веществ.

МАРКИРОВКА

На этикетке указывают название всех добавленных противомикробных консервантов.

Растворы для полоскания горла

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Растворы для полоскания горла - водные растворы, предназначенные для полоскания горла с целью достижения местного эффекта. Эти растворы не предназначены для глотания. Они выпускаются в виде готовых к применению растворов или концентрированных растворов для последующего разбавления. Они могут изготавливаться из порошков или таблеток, которые перед применением растворяют в воде.

Растворы для полоскания горла могут содержать вспомогательные вещества для обеспечения уровня pH, который в большинстве случаев является нейтральным.

Растворы для полоскания рта

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Растворы для полоскания рта - водные растворы, предназначенные для обработки слизистой оболочки полости рта, как правило, после их разбавления водой. Эти растворы не предназначены для глотания. Они выпускаются в виде готовых к применению растворов или концентрированных растворов для последующего разбавления. Они могут изготавливаться из порошков или таблеток, которые перед применением растворяют в воде.

Растворы для полоскания горла могут содержать вспомогательные вещества для обеспечения уровня pH, который в большинстве случаев является нейтральным.

Растворы для дёсен

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Растворы для дёсен предназначаются для нанесения на десну посредством соответствующего аппликатора.

Растворы и суспензии для слизистой оболочки полости рта

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Растворы и суспензии для слизистой оболочки полости рта - жидкие лекарственные средства, предназначенные для введения в полость рта посредством соответствующего аппликатора.

Суспензии могут образовывать осадок, который быстро ресуспендируется при взбалтывании, образуя суспензию достаточно стабильную, чтобы обеспечить однородность лекарственного средства при дозировании.

Мягкие лекарственные средства для слизистой оболочки полости рта

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Мягкие лекарственные средства для слизистой оболочки полости рта - гидрофильные мази, гели или пасты, предназначенные для введения в полость рта или нанесения на её отдельную область, такую как десна (гель для дёсен, паста для дёсен). Они могут выпускаться в однодозовых контейнерах.

Мягкие лекарственные средства для слизистой оболочки полости рта должны соответствовать требованиям, изложенным в статье *«Мягкие лекарственные средства для местного применения».*

Капли и спреи для слизистой оболочки полости рта и сублингвальные спреи

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Капли и спреи для слизистой оболочки полости рта и сублингвальные спреи - растворы, эмульсии или суспензии, предназначенные для достижения местного или системного эффекта. Они применяются путём инстилляции или распыления в полость рта или на определенную его область, например, распыление под язык (сублингвальный спрей) или в горло (орофарингиальный спрей).

Эмульсии могут расслаиваться, но быстро восстанавливаются путём взбалтывания. Суспензии могут образовывать осадок, который быстро ресуспендируется при взбалтывании, образуя суспензию достаточно стабильную, чтобы обеспечить однородность лекарственного средства при дозировании.

Жидкие спреи для слизистой оболочки полости рта выпускают в контейнерах с распылителем или контейнерах, находящихся под давлением, и снабжены соответствующим адаптером с или без дозатора, которые должны соответствовать требованиям, изложенным в статье «*Лекарственные средства, находящиеся под давлением*».

Размер капелек спрея должен быть таким, чтобы огранить депонирование их в полости рта или горла в соответствии с предназначением лекарственного средства.

ИСПЫТАНИЯ

Если нет других указаний в частных статьях, капли для слизистой оболочки полости рта, спреи для слизистой оболочки полости рта и сублингвальные спреи, предназначенные для получения системного эффекта, выпускаемые в однодозовых контейнерах, должны выдерживать следующие испытания.

Однородность массы. Капли для слизистой оболочки полости рта в виде растворов должны выдерживать следующее испытание: освобождают каждый из 10 контейнеров как можно полнее и взвешивают содержимое каждого контейнера, определяют среднюю массу содержимого. Масса содержимого не более чем двух контейнеров может отклоняться более чем на 10 % от средней массы, и масса содержимого ни одного контейнера не должна отклоняться более чем на 20 % от средней массы.

Дозированные спреи для слизистой оболочки полости рта и сублингвальные спреи, представляющие собой растворы, должны выдерживать следующее испытание: один раз нажимают на клапан и высвободившееся содержимое отбрасывают. Спустя не менее 5 с нажимают на клапан и высвободившееся содержимое отбрасывают. Повторяют эту операцию еще три раза. Взвешивают контейнер, нажимают на клапан и снова взвешивают контейнер. По разнице вычисляют массу высвободившегося содержимого. Повторяют эту операцию еще для девяти контейнеров. Масса содержимого не более чем двух контейнеров может отклоняться более чем на 25 % от средней массы, но не более чем на 35 %.

Однородность содержания *(2.9.6)*. Капли для слизистой оболочки полости рта, представляющие собой суспензии или эмульсии, должны выдерживать следующее испытание: освобождают каждый контейнер как можно полнее и определяют содержание действующего вещества для каждого контейнера. Они должны выдерживать испытание на однородность содержания (тест В).

Однородность дозирования. Дозированные спреи для слизистой оболочки полости рта и сублингвальные спреи, представляющие собой суспензии или эмульсии, должны выдерживать следующее испытание. Используют прибор, позволяющий количественно удерживать дозу после нажатия распылительного устройства.

Встряхивают контейнер в течение 5 с, выпускают дозу и отбрасывают. Спустя не менее 5 с снова встряхивают контейнер в течение 5 с, выпускают дозу и отбрасывают. Повторяют указанную операцию три раза. Спустя 2 с нажимают на распылительное устройство, направляя дозу спрея в собирающий сосуд. Содержимое собирающего сосуда путем последовательных промываний растворителем, указанным в частной статье, объединяют и определяют содержание действующего вещества в объединенном растворе.

Повторяют вышеописанную процедуру еще для девяти контейнеров.

Если нет других указаний в частной статье, лекарственное средство удовлетворяет требованиям, если содержание действующего вещества в дозе не более чем одного контейнера не укладывается в пределы от 75% до 125%, но не выходит за пределы от 65% до 135% от среднего значения.

Если содержание действующего вещества в дозе двух или трех отдельных

контейнеров не укладываются в пределы от 75% до 125%, но укладывается в пределы от 65% до 135%, повторяют испытание ещё для 20 контейнеров. Лекарственное средство выдерживает испытание, если содержание действующего вещества в дозе не более чем трех контейнеров не укладывается в пределы от 75% до 125%, но не выходит за пределы от 65% до 135% от среднего значения.

Леденцы и пастилки

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Леденцы и пастилки - твёрдые однодозовые лекарственные средства, предназначенные для рассасывания с целью достижения обычно местного эффекта в полости рта и горле. Содержат одно или более действующих веществ, обычно на ароматической или сладкой основе, и предназначаются для медленного растворения или распада во рту в результате рассасывания.

Леденцы - твёрдые лекарственные средства, изготавливаемые путём формовки. Пастилки - мягкие, эластичные лекарственные средства, изготавливаемые путём формовки из смесей, содержащих природные или синтетические полимеры или резину и подсластители.

Прессованные леденцы

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Прессованные леденцы - твёрдые однодозовые лекарственные средства, предназначенные для рассасывания с целью получения местного или системного эффекта. Они изготавливаются путём сжатия, часто имеют форму ромба.

Прессованные леденцы соответствуют общему определению таблеток.

ПРОИЗВОДСТВО

При производстве прессованных леденцов следует предпринять меры, гарантирующие, что леденцы обладают соответствующей механической прочностью, не крошатся при разламывании рукой. Это испытывают, как указано в статье *«Прочность таблеток без оболочки на истирание» (2.9.7)* и статье *«Прочность таблеток на сжатие» (2.9.8.).*

ИСПЫТАНИЯ

Растворение. Для прессованных леденцов, предназначенных для получения системного эффекта, проводят испытание для подтверждения высвобождения действующего вещества или веществ.

Сублигвальные таблетки и таблетки для медленного растворения в щечном кармане

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Сублигвальные таблетки и таблетки для медленного растворения - твёрдые однодозовые лекарственные средства для введения под язык или в полость рта, соответственно, с целью получения системного эффекта. Они изготавливаются путём прессования смеси порошков или гранул в таблетки подходящей для их использования формы. Сублигвальные таблетки и таблетки для медленного растворения соответствуют общему определению таблеток.

ПРОИЗВОДСТВО

При производстве сублигвальных таблеток и таблеток для медленного растворения в щечном кармане предпринимают меры, гарантирующие, что таблетки обладают соответствующей механической прочностью, не крошатся при

разламывании рукой. Это испытывают, как указано в статье *«Прочность таблеток без оболочки на истирание» (2.9.7)* и статье *«Прочность таблеток на сжатие» (2.9.8).*

ИСПЫТАНИЯ

Растворение. Проводят испытание для подтверждения высвобождения действующего вещества или веществ, если нет других указаний в частной статье.

Капсулы для слизистой оболочки полости рта

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Капсулы для слизистой оболочки полости рта - мягкие капсулы, предназначенные для жевания или рассасывания.

Слизистые адгезивные лекарственные средства

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Слизистые адгезивные лекарственные средства – лекарственные средства, содержащие одно или более действующих веществ и предназначенные для системной абсорбции через слизистую оболочку щеки в течение длительного периода времени. Они могут выпускаться в виде слизистых адгезивных таблеток для медленного растворения в щечном кармане или других слизистых адгезивных твёрдых или мягких лекарственных средств.

Слизистые адгезивные таблетки для медленного растворения в щечном кармане изготавливают путём прессования моно- или мультислойных таблеток. Они обычно содержат гидрофильные полимеры, при их увлажнении слюной образуется тягучий гидрогель, который адгезируется слизистой оболочкой полости рта.

ПРОИЗВОДСТВО

При производстве слизистых адгезивных таблеток для медленного растворения в щечном кармане предпринимают меры, гарантирующие, что таблетки обладают соответствующей механической прочностью, не крошатся при разламывании рукой. Это испытывают, как указано в статье *«Прочность таблеток без оболочки на истирание» (2.9.7)* и статье *«Прочность таблеток на сжатие» (2.9.8.).*

ИСПЫТАНИЯ

Растворение. Проводят подходящее испытание для подтверждения высвобождения действующего вещества или веществ, если нет других указаний в частной статье.

ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА ДЛЯ РЕКТАЛЬНОГО ПРИМЕНЕНИЯ

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Лекарственные средства для ректального применения предназначены для введения в прямую кишку с целью получения системного или местного эффекта. Они могут быть также использованы для диагностических целей.

Контейнеры для ректальных лекарственных средств, должны соответствовать требованиям статей *«Материалы, используемые для производства контейнеров» (3.1 и подразделы)* и *«Контейнеры» (3.2 и подразделы)*, если нет других указаний в частной статье.

Ректальные лекарственные средства можно классифицировать как:

- суппозитории;

- ректальные капсулы;
- ректальные растворы, суспензии и эмульсии;
- порошки и таблетки для приготовления ректальных растворов или суспензий;
- мягкие лекарственные средства для ректального применения;
- ректальные пены;
- ректальные тампоны.

ПРОИЗВОДСТВО

При разработке лекарственных средств для ректального применения, в состав которых входят антимикробные консерванты, уполномоченному органу представляют данные, подтверждающие эффективность выбранных консервантов. Метод определения и критерии оценки эффективности консервантов должны соответствовать требованиям статьи *«Эффективность антимикробных консервантов» (5.1.3).*

При производстве, упаковке, хранении и реализации лекарственных средств для ректального применения предпринимают меры, обеспечивающие микробиологическую чистоту в соответствии с требованиями статьи *«Микробиологическая чистота лекарственных средств» (5.1.4).*

При производстве мягких и жидких лекарственных средств для ректального применения, содержащих диспергированные частицы предпринимают меры, обеспечивающие необходимый размер частиц и его контроль.

ИСПЫТАНИЯ

Однородность содержания *(2.9.6)*. Твердые лекарственные средства в однодозовых контейнерах с содержанием действующего вещества менее 2 мг или менее 2% от общей массы содержимого должны выдерживать испытание на однородность содержания действующего вещества в единице дозированного лекарственного средства (тест А – ректальные таблетки или тест В – суппозитории, ректальные капсулы), если нет других указаний в частной статье. Если лекарственное средство содержит более одного действующего вещества, это требование распространяется только на те вещества, содержание которых соответствуют выше указанным условиям.

Однородность массы *(2.9.5).* Твердые лекарственные средства в однодозовых контейнерах должны выдерживать испытание на однородность массы для единицы дозированного лекарственного средства. Испытание на однородность массы не требуется, если испытание на однородность содержания предусмотрено для всех действующих веществ.

Определение массы или объема содержимого контейнера *(2.9.28).* Жидкие и мягкие лекарственные средства для ректального применения, выпускаемые в однодозовых контейнерах, должны выдерживать испытание на массу или объем содержимого контейнера.

Растворение. Проводят испытание для подтверждения соответствующего высвобождения действующего вещества твердых лекарственных средств в однодозовых контейнерах, например, одним из способов, описанных для суппозиториев и мягких капсул в статье *«Тест «Растворение» для твердых дозированных форм» (2.9.3).*

Если проводят испытание по показателю «Растворение», испытание по показателю «Распадаемость» не требуется.

МАРКИРОВКА

На этикетке указывают название всех добавленных антимикробных консервантов.

Суппозитории

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Суппозитории – твердые однодозовые лекарственные средства, которые содержат одно или более действующих веществ, диспергированных или растворенных в подходящей основе, которая растворяется или диспергируется в воде или плавиться при температуре тела. Форма, объем и консистенция должны соответствовать ректальному применению.

В состав суппозиториев, если необходимо, могут входить вспомогательные вещества, такие как разбавители, адсорбенты, поверхностно-активные вещества и смазывающие вещества, антимикробные консерванты, а также красители, разрешенные к медицинскому применению.

ПРОИЗВОДСТВО

Суппозитории изготавливают прессованием или методом выливания. # В условиях аптеки наряду с вышеуказанными методами может использоваться метод ручного формования. Если необходимо, действующее вещество или вещества предварительно измельчают и просеивают через соответствующие сита. Если суппозитории изготавливают методом выливания, приготовленную массу предварительно расплавляют при нагревании и разливают в соответствующие формы. Суппозитории затвердевают при охлаждении. Чтобы обеспечить процесс затвердевания, вводят такие вспомогательные вещества, как твердый жир, макроголы, масло какао, разные гелеобразующие смеси, которые содержат, например, желатин, воду и глицерин.

Проводят определение времени деформации липофильных суппозиториев *(2.9.22)* и/или определение устойчивости суппозиториев к разрушению *(2.9.24)* и определение времени растворения для липофильных суппозиториев, если нет других указаний в частной статье.

Проводят испытание для подтверждения соответствующего высвобождения действующего вещества или веществ из суппозиториев, предназначенных для модифицированного высвобождения или пролонгированного местного действия.

При производстве суппозиториев, содержащих диспергированные частицы действующих веществ, предпринимают меры, обеспечивающие необходимый размер частиц и его контроль.

ИСПЫТАНИЯ

Распадаемость. Если суппозитории не предназначены для модифицированного высвобождения или пролонгированного местного действия, они должны выдерживать испытание *«Распадаемость суппозиториев и пессариев»* *(2.9.2)*. Состояние суппозиториев на гидрофобной основе исследуют через 30 мин, а суппозиториев на гидрофильной основе – через 60 мин, если нет других указаний в частной статье.

Ректальные капсулы

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Ректальные капсулы (суппозитории с оболочкой) – твердые однодозовые лекарственные средства, в основном сходные по определению с мягкими капсулами, приведенному в статье *«Капсулы»*, за исключением того, что они могут иметь скользящую оболочку. Они должны быть гладкими, однородными по внешнему виду и иметь удлиненную форму.

ПРОИЗВОДСТВО

Проводят испытание для подтверждения соответствующего высвобождения действующего вещества или веществ из ректальных капсул, предназначенных для модифицированного высвобождения или пролонгированного местного действия.

ИСПЫТАНИЯ

Распадаемость. Если ректальные капсулы не предназначены для модифицированного высвобождения или пролонгированного местного действия, они должны выдерживать испытание на распадаемость суппозиториев и пессариев *(2.9.2)*. Состояние капсул исследуют через 30 мин, если нет других указаний в частной статье.

Ректальные растворы, эмульсии и суспензии

Ректальные растворы, эмульсии и суспензии – жидкие лекарственные средства, предназначенные для введения в прямую кишку с целью оказания системного или местного действия. Они могут быть также использованы для диагностических целей.

Ректальные растворы, эмульсии и суспензии выпускают в однодозных контейнерах и содержат одно или более действующих веществ, растворенных или диспергированных в воде, глицерине, макроголах или в других подходящих растворителях.

Ректальные эмульсии могут расслаиваться, однако быстро восстанавливаются при взбалтывании.

Ректальные суспензии могут образовывать осадок, который быстро ресуспендируется при взбалтывании, образуя суспензию достаточно стабильную, чтобы обеспечить однородность лекарственного средства при дозировании.

Ректальные растворы, эмульсии и суспензии могут содержать вещества, предназначенные для обеспечения необходимой вязкости, создания или стабилизации необходимого значения pH, для улучшения растворимости действующего вещества или веществ или для стабилизации лекарственного средства. Они не должны отрицательно влиять на основное действие лекарственного средства или, в используемых концентрациях, не должны оказывать нежелательного местного раздражающего действия.

Ректальные растворы, эмульсии и суспензии выпускают в контейнерах объемом от 2,5 мл до 2000 мл. Контейнер должен быть приспособлен для введения лекарственного средства в прямую кишку или снабжен подходящей насадкой.

Порошки и таблетки для приготовления ректальных растворов или суспензий

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Порошки и таблетки для приготовления ректальных растворов и суспензий – однодозовые лекарственные средства, которые растворяют или диспергируют в воде непосредственно перед применением. Они могут содержать вспомогательные вещества, которые способствуют растворению или диспергированию или предотвращают агрегацию частиц.

После растворения или диспергирования они должны выдерживать требования, которые предъявляют к ректальным растворам или суспензиям соответственно.

ИСПЫТАНИЯ

Распадаемость. Таблетки для приготовления ректальных растворов или суспензий должны выдерживать испытание на распадаемость суппозиториев и

пессариев *(2.9.1)*. Они должны распадаться в течение 3 мин, используя в качестве жидкой среды *воду Р* при температуре от 15^{0}С до 25^{0}С.

МАРКИРОВКА

На этикетке указывают:

- способ приготовление ректальных растворов или суспензий;
- условия и срок хранения раствора или суспензии после приготовления.

Мягкие лекарственные средства для ректального применения

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

К мягким лекарственным средствам для ректального применения относятся линименты, мази, кремы и гели.

Они обычно представляют собой однодозовые лекарственные средства в контейнерах, снабженных подходящей насадкой.

Мягкие лекарственные средства для ректального применения должны выдерживать требования статьи *«Мягкие лекарственные средства для местного применения».*

Ректальные пены

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Ректальные пены должны соответствовать требованиям статьи *«Пены медицинские».*

Ректальные тампоны

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Ректальные тампоны – твердые однодозовые лекарственные средства, предназначенные для введения в нижний отдел прямой кишки на определенное время.

Они должны соответствовать требованиям статьи *«Тампоны медицинские».*

ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА НА ОСНОВЕ АЛЛЕРГЕНОВ

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Лекарственные средства на основе аллергенов – продукты, являющиеся экстрактами природного сырья, содержащие аллергены и предназначенные для диагностики в естественных условиях *in* vivo или лечения аллергических заболеваний (реакции гиперчувствительности), вызванных данным аллергеном. Аллергены – вещества, вызывающие аллергические заболевания (реакции гиперчувствительности). Чаще всего аллергены имеют белковую природу.

Лекарственные средства на основе аллергенов могут выпускаться как в форме готовых продуктов в сухом виде в нефасованном состоянии, в виде растворов или суспензий, предназначенных для дальнейшего концентрирования или разведения перед использованием, так и в форме готовых растворов, суспензий или препаратов, высушенных методом сублимации (вымораживания). Лекарственные средства на основе аллергенов, предназначенные для парентерального, эндобронхиального и конъюнктивального введения должны быть стерильными.

Лекарственные средства на основе аллергенов для диагностики обычно готовятся, как немодифицированные экстракты в 50% об/об растворе глицерина для проведения кожных скарификационных проб. Для диагностики путем подкожного введения или для диагностики с выполнением эндоназальных, конъюнктивальных или эндобронхиальных провокационных тестов соответствующие растворы аллергенов могут быть изготовлены путем разведения водного или глицеринового экстрактов или же путем растворения экстрактов, высушенных сублимацией, непосредственно перед введением.

Лекарственные средства на основе аллергенов, используемые для иммунотерапии, могут быть в виде либо немодифицированных экстрактов, либо в виде экстрактов, модифицированных химически и/или путем адсорбции на различные носители (например, гидроокись алюминия, фосфат кальция или тирозин).

Данная статья не применяется: к химическим продуктам, которые используются исключительно для диагностики контактного дерматита; к химически синтезируемым продуктам; к аллергенам, полученным с использованием технологии рекомбинантной ДНК; к готовым продуктам, применяемым у отдельных пациентов.

ПРОИЗВОДСТВО

Лекарственные средства на основе аллергенов получают из различных групп исходных аллергенных материалов. Обычно они выпускаются в виде сухого нефасованного продукта (in bulk) и затем, непосредственно перед использованием, разводятся или концентрируются. Их можно переработать, чтобы изменить или уменьшить интенсивность аллергенного действия или оставить без изменений.

Исходные материалы

Источником сырья для приготовления лекарственных средств на основе аллергенов, главным образом, является пыльца, частицы почвы, клещи, эпителий животных, яды перепончатокрылых насекомых и некоторые пищевые продукты.

Описывают происхождение источника сырья, его природу, метод сбора или получения, предварительную обработку, а также порядок и условия хранения, которые минимизируют их разрушение.

Сбор или получение, а также обработка исходных материалов должны быть выполнены таким образом, чтобы, по возможности, сохранялся однородный качественный и количественный состав аллергена от партии к партии.

Пыльца. Содержание потенциально опасных химических примесей, таких как пестициды и тяжелые металлы, должно быть минимизировано. В пыльце допускается содержание не более 1 % чужеродной пыльцы и не более 1 % почвенных спор, что определяется микроскопическим исследованием.

Клещи и частицы почвы. Биологически активные примеси, такие как микотоксины, в частицах почвы должны быть минимизированы, и любое их наличие должно нормироваться. Следует предпринимать все необходимые меры предосторожности, чтобы свести к минимуму присутствие любых аллергенных компонентов в средах, используемых для культивирования клещей и почв, как источников исходных материалов. Питательные среды, которые содержат вещества человеческого или животного происхождения, должны быть откорректированы и, при

необходимости, соответствующим образом обработаны, чтобы гарантировать инактивацию или удаление потенциально патогенных микроорганизмов.

Эпителий животных. Эпителий животных должен быть получен от здоровых специально отобранных животных, чтобы исключить попадание возможных возбудителей антропозоонозных заболеваний.

Производственный процесс.

Лекарственные средства на основе аллергенов получают в основном путем экстракции. Они могут быть освобождены от исходных материалов путем применения соответствующих методов очистки, для которых установлена способность сохранять биологические свойства аллергенного компонента. Лекарственные средства на основе аллергенов производятся в специальных условиях, позволяющих минимизировать микробный рост и ферментную деградацию аллергена.

Процедуры очистки, если таковые проводятся, предназначаются для того, чтобы свести к минимуму наличие любых потенциальных раздражающих компонентов с низкой молекулярной массой или других неаллергенных компонентов.

Лекарственные средства на основе аллергенов могут содержать соответствующий антибактериальный консервант. Вид и концентрация антибактериального консерванта должны нормироваться.

Производственный процесс включает различные стадии.

Нативные экстракты аллергенов получают выделением из экстрагируемых исходных материалов.

Промежуточные продукты на основе аллергенов получают или при дальнейшей обработке нативных аллергенных экстрактов, или посредством их модификации. Модификация может быть следствием химических (химическое сопряжение связей) или физических процессов (физическая адсорбция на различных носителях, например, гидроокиси алюминия, фосфате кальция или тирозине). Они также могут быть модифицированы, как при включении в липосомы или микросферы, так и путем добавления к аллергенам других биологически активных веществ с целью увеличения эффективности или безопасности. Промежуточные продукты на основе аллергенов могут быть высушены сублимацией.

Нефасованные (in bulk) лекарственные средства на основе аллергенов состоят из аллергенов в виде растворов или суспензий, которые не требуют дальнейшей обработки или модификации, и готовы к разведению или окончательной расфасовке в емкости.

СОБСТВЕННЫЙ СТАНДАРТНЫЙ ПРЕПАРАТ

В качестве собственного контрольного средства (ССП) выбирают соответствующий репрезентативный образец, который обладает определенным набором характеристик и используется для контроля постоянства состава лекарственных средств на основе аллергенов из серии в серию. Хранение ССП осуществляется в определенных количествах и в условиях, гарантирующих его стабильность, обычно в виде субстанции, высушенной методом сублимации.

Характеристика собственного стандартного препарата

Диапазон характеристик ССП зависит от природы исходного аллергенного материала, сведений о его аллергенных компонентах и наличия подходящих реактивов, а также от предназначения. Квалифицированное по отличительным характеристикам ССП используется, как эталон при проверке партии нативных природных аллергенных компонентов или промежуточных продуктов на основе аллергенов, и, если возможно, при проверке партии готовых лекарственных средств на основе аллергенов.

Собственный стандартный препарат (ССП) характеризуется посредством определения содержания протеина и его профиля, для чего используются подходящие методы (например, изоэлектрическая фокусировка, электрофорез на полиакриламидном геле, иммуноэлектрофорез или молекулярно-массовая профилировка). Аллергенные компоненты могут быть обнаружены посредством применения соответствующих методов (например, иммуноблоттинг-анализ или перекрестный иммуноэлектрофорез). Характеристика аллергенных компонентов может включать идентификацию отдельных аллергенов, основанную на серологической или другой методике, используя общие или индивидуальные аллергосыворотки, а также аллерген-специфичные поликлональные или моноклональные антитела. Если имеются аллергенные контрольные вещества, то может быть определено содержание конкретных отдельных аллергенов. Когда это возможно, конкретные отдельные аллергены идентифицируются в соответствии с международной установленной спецификацией.

Если возможно, биологическая сила ССП определяется посредством методик, используемых в условиях целостного организма *(in vivo)*, таких, как кожные скарификационные тесты, результаты при этом выражаются в единицах биологической активности. В противном случае для некоторых экстрактов, биологическая сила может определяться посредством иммунологического анализа (например, основанного на определении ингибирования связывающей способности определенных типов антител группы иммуноглобулина Е), или посредством количественных методов анализа в случае присутствия одного главного компонента в продукте.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ

Идентичность лекарственного средства на основе аллергенов подтверждается как на промежуточной, так и любой другой подходящей стадии путем сравнения с ССП, используя соответствующие методы идентификации профиля протеинов (например, изоэлектрическая фокусировка, электрофорез на полиакриламидном геле додецилсульфата [лаурилсульфата] натрия или иммуноэлектрофорез).

ИСПЫТАНИЯ

Чтобы характеризовать аллергены качественно и количественно, разработаны различные биохимические и иммунологические испытания. Однако, некоторые из этих методов, в частности применяемые для определения активности аллергена и его профиля, в настоящее время не могут быть применены ко всем продуктам данной группы вследствие того, что нет достаточной информации об аллергенных компонентах или требующихся реактивах. В соответствии с этим, лекарственные средства на основе аллергенов классифицируются на различные категории с возрастанием

требований к их испытанию в зависимости от их качества и предполагаемого использования.

С готовыми лекарственными средствами, если это возможно, проводятся испытания указанные ниже. В противном случае, они должны быть выполнены с экстрактами в ходе производственного процесса по возможности на более поздней стадии, например, на стадии непосредственно предшествующей выпуску готового продукта (модификация, разведение и т.п.)

Вода (2.5.12). Не более 5 % для продуктов, высушенных сублимацией (вымораживанием).

Стерильность (2.6.1). Лекарственные средства на основе аллергенов, предназначенные для парентерального, эндобронхиального и конъюнктивального введения, должны выдерживать тест на стерильность.

Содержание протеина. От 80 % до 120 % от указанного количества. Если биологическая активность аллергена может быть определена, то испытание на содержание протеина может не проводиться.

Профиль протеина. Состав протеина, определяемый подходящими методами, должен соответствовать ССП.

Аномальная токсичность (2.6.9). Лекарственные средства на основе аллергенов, полученные из почв и предназначенные для парентерального применения (за исключением кожной скарификационной пробы), подвергают испытанию на аномальную токсичность в соответствии с требованиями, предъявляемыми к иммунным сывороткам и вакцинам для медицинского применения.

Различные дополнительные испытания, в какой-то степени увеличивающие избирательность, могут быть применены, в зависимости от представляющего интерес аллергенного продукта, но в любом случае для аллергенных средств, предназначенных для терапевтических целей, должен применяться тест, подтверждающий пригодность с измерением силы воздействия (общая аллергенная активность, определение отдельных аллергенов или некоторые другие определяющие тесты).

Алюминий (2.5.13). Не менее 80 % и не более 120 % от указанного количества (когда гидроокись алюминия или фосфорнокислый алюминий используется как адсорбент), но в любом случае не более 1,25 мг в одной человеческой дозе, если не предписано иначе.

Кальций (2.5.14). Не менее 80 % и не более 120 % от указанного количества, когда фосфат кальция используется как адсорбент.

Профиль антигена. Антигены идентифицируются посредством подходящих методов, используя соответствующие антиген-специфичные антитела животного.

Профиль аллергена. Соответствующие аллергенные компоненты идентифицируются посредством надлежащих методов, используя аллерген-специфичные антитела человека.

Общая аллергенная активность. От 50 % до 200 % от указанного количества, при определении методом ингибирования связывающей способности

антител определенного типа группы иммуноглобулина Е или иным надлежащим эквивалентным методом *in vitro*.

Отдельные аллергены. От 50 % до 200 % от указанного количества, определенные надлежащим методом.

ХРАНЕНИЕ

Адсорбированное лекарственное средство на основе аллергенов не должно подвергаться замораживанию.

МАРКИРОВКА

На этикетке указывают:

– биологическую активность (силу) и/или содержание протеина и/или концентрацию экстракта;

– способ применения и назначение;

– условия хранения;

– наименование и количество добавленного антимикробного консерванта;

– для высушенных сублимацией (вымораживанием) средств:

  – наименование, состав и объем жидкости для приготовления, которая будет добавлена;

  – период времени, в течение которого должен использоваться приготовленный раствор;

  – где применимо, что лекарственное средство стерильно;

  – наименование и количество адсорбента при его наличии.

ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА НА ОСНОВЕ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Растительные лекарственные средства – лекарственные средства, полученные путем экстрагирования, дистилляции, отжима, фракционирования, очистки, концентрирования или ферментации соответствующего растительного сырья. К ним относятся или измельченные или порошкообразные растительные лекарственные средства, настойки, экстракты, эфирные масла, выжатые соки и обработанные экссудаты.

Растительные чаи должны выдерживать требования статье *«Растительные чаи».*

Растворимые растительные чаи состоят из порошка или гранул, содержащих одно или более растительное сырье, и используются для приготовления оральных растворов для внутреннего применения.

Лекарственное растительное сырье

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Лекарственное растительное сырье - это цельные растения, фрагменты растений или измельченные растения, части растений, морские водоросли, грибы, лишайники в не переработанной форме, обычно высушенные, а иногда и в свежем виде. Некоторые эксудаты, которые не были подвергнуты специальной обработке, также могут относиться к лекарственному растительному сырью. Лекарственное растительное сырье точно определяется его ботаническим научным названием и в соответствии с имеющейся биноминальной системой (род, вид, разновидность и класс).

ПРОИЗВОДСТВО

Лекарственное растительное сырье получают из специально выращиваемых или из дикорастущих растений. Чтобы гарантировать высокое качество лекарственного растительного сырья важно соблюдать соответствующие правила отбора для выращивания, сбора урожая, сушки, измельчения и условий хранения.

Лекарственное растительное сырье должно быть по возможности тщательно очищено от примесей, таких как остатки почвы, пыли, грязи, загрязнений наподобие грибов, насекомых и других примесей животного происхождения. Оно не должно быть подгнившим.

Если применялась дезинфицирующая обработка, необходимо убедиться, что не пострадали части растения и что после обработки на растении не остались примеси дезинфицирующих средств. Для дезинфекции лекарственного растительного сырья запрещается использование окиси этилена.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ

Лекарственное растительное сырье идентифицируется с использованием их макроскопических и микроскопических признаков, могут применяться в случае необходимости и некоторые другие методы испытаний (например, тонкослойная хроматография).

ИСПЫТАНИЯ

Проводится испытание на посторонние примеси (*2.8.2*), если не указано иначе в частной статье.

Специальное испытание на соответствие может проводиться, если есть подозрение, что растение другого вида.

При необходимости лекарственное растительное сырье подвергают испытаниям, например: на содержание общей золы (*2.4.16*), на содержание золы, нерастворимой в кислоте хлористоводородной (*2.8.1*), на содержание экстрактивных веществ, на определение коэффициента набухания (*2.8.4*) и показателя горечи.

Испытание на потерю в массе при высушивании (*2.2.32*) для лекарственного растительного сырья проводится, если не указано иначе в частной статье. Определение воды (*2.2.13*) выполняется для лекарственного растительного сырья с высоким содержанием эфирных масел.

Лекарственное растительное сырье должно соответствовать требованиям в отношении остатка пестицидов (*2.8.13*). Эти требования применяются с учетом происхождения растения, его дальнейшего использования с учетом протокола полных данных по обработке определенной партии растения. Содержание остатков

пестицидов может быть определено посредством метода, описанного в приложении к основному методу.

Необходимо учитывать также риск загрязнения лекарственного растительного сырья тяжелыми металлами. Если в частной статье не указывается предельное содержание тяжелых металлов или других отдельных элементов, такие предельные нормы при необходимости могут быть установлены.

Рекомендации по исследованию микробиологической чистоты продуктов, состоящих из одного или нескольких видов лекарственного растительного сырья, приводятся в разделе *«Микробиологическая чистота лекарственных средств»* (*5.1.4* . - Категория 4).

Может возникнуть необходимость и в исследовании на предельное содержание афлатоксинов.

При определенных обстоятельствах необходимо учитывать и риск возможного радиоактивного загрязнения.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ СОДЕРЖАНИЕ.

Если нет специальных требований, тест на количественное содержание проводится с использованием подходящего метода для количественного определения.

ХРАНЕНИЕ

Хранят в защищенном от света месте.

Растительные чаи

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Растительные чаи состоят из одного или более растительного сырья и предназначены для приготовления жидких лекарственных средств для орального применения путем заваривания или настаивания. Эти лекарственные средства готовят непосредственно перед применением.

Растительные чаи изготавливают «ангро» или расфасовывают в пакетики.

Растительное сырье, входящее в состав растительного чая, должно соответствовать требованиям общей и частной статьи.

При определении микробиологической чистоты растительных чаев (*5.1.4. – Категория 4*) должны учитывать используемый метод приготовления (используется кипяченная или не кипяченая вода).

ИДЕНТИФИКАЦИЯ

Для идентификации растительного сырья, входящего в растительный чай, применяют соответствующие методики.

ИСПЫТАНИЯ

Соотношение растительного сырья, входящего в растительный чай определяется соответствующими методами.

Растительные чаи, расфасованные в пакетики, должны выдерживать следующие испытания.

Однородность массы. Определяют среднюю массу 20 выбранных случайно единиц следующим образом: взвешивают один полный пакетик растительного чая,

затем его открывают таким образом, чтобы не были утеряны какие-либо фрагменты. Пакетик полностью очищают от содержимого при помощи щеточки. Взвешивают пустой пакетик и вычисляют массу содержимого пакетика путем вычитания. Повторяют данные действия на девятнадцати оставшихся пакетиках. Если нет других указаний, то не более, чем две из двадцати индивидуальных масс содержимого отклоняются от средней массы содержимого больше, чем на процентное отклонение, приведенное в таблице, но не более чем вдвое.

Средняя масса	Допустимое отклонение
менее 1,5 г	15 %
от 1,5 г до 2,0 г включительно	10 %
более 2,0 г	7,5 %

ХРАНЕНИЕ

Хранят в защищенном от света месте, если нет других указаний в частной статье.

Экстракты

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Экстракты – лекарственные средства жидкой (жидкие экстракты и настойки), мягкой (густые экстракты) или твердой (сухие экстракты) консистенции, получаемые из лекарственного растительного сырья или животного материала, которые обычно используются в высушенном виде.

Известно несколько разных типов экстрактов. Стандартизованные экстракты – экстракты, в которых содержание компонентов с известной терапевтической активностью регулируется в определенных пределах. Стандартизация достигается смешиванием экстракта с инертным материалом или другими сериями экстракта. Количественные экстракты – экстракты, имеющие определенный состав. Их стандартизацию проводят смешением разных серий экстракта. Другие экстракты характеризуются процессом их производства (в зависимости от вида используемого лекарственного растительного сырья или животного материала, растворителя, условий экстракции) и их спецификаций.

ПРОИЗВОДСТВО

Экстракты изготавливают соответствующими методами, используя спирт или другой подходящий растворитель. Разные серии лекарственного растительного сырья или животного материала перед экстракцией могут смешивать. В некоторых случаях материал, что экстрагируется, могут подвергать предварительной обработке, например, инактивации ферментов, измельчению или обезжириванию. После экстракции ненужные материалы, если необходимо, удаляют.

Лекарственное растительное сырье, животные материалы и органические растворители, что используются при изготовлении экстрактов, должны выдерживать требования соответствующих статьях Фармакопеи. Для густых и сухих экстрактов, в которых растворители удаляют выпариванием, могут использовать перегнанные или рецеркулированные растворители при условии, что процесс перегонки контролируется, и растворитель проверяют на соответствие стандартам перед повторным использованием или смешиванием с другим предложенным материалом. Вода, которую используют при экстрагировании, должна быть соответствующего качества. Подходящей водой считается вода, которая выдерживает требования статьи «Вода очищенная», за исключением испытания на содержание бактериальных эндотоксинов, приведенного в данной статье. Питьевую воду можно

использовать, при условии, что она выдерживает требования соответствующей спецификации, обеспечивающие надлежащее качество воды для производства соответствующего экстракта.

При необходимости, концентрирование до желаемой консистенции проводят, используя подходящие методы, обычно под пониженным давлением и с использованием температуры, при которой разрушение компонентов сводится к минимуму. Эфирные масла, выделенные в процессе обработки, могут быть добавлены в экстракт на определенной стадии производственного процесса. На разных стадиях производственного процесса могут быть добавлены вспомогательные вещества, например, для обеспечения гомогенности или консистенции. Также могут быть добавлены стабилизаторы и антимикробные консерванты.

Экстрагирование определенным растворителем проводят до стандартных соотношений характерных компонентов в материале, который экстрагируется; однако в процессе производства стандартизованных или количественных экстрактов, процедуры очистки могут привести к изменению этих пропорций по сравнению с составляющими вещества. Такие экстракты называют «очищенными».

ИДЕНТИФИКАЦИЯ

Идентификацию экстрактов проводят, используя подходящие методы.

ИСПЫТАНИЯ

Учитывая анализ лекарственного растительного сырья или животного материала, который используют в производстве, и, оценив процесс производства, для экстрактов могут быть проведены испытания на микробиологическую чистоту (*5.1.4*), тяжелые металлы, афлатоксины, содержание пестицидов (*2.8.13*).

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Где возможно, определяют количественное содержание компонентов экстрактов соответствующими методами.

МАРКИРОВКА

На этикетке указывают:

- тип использованного растительного сырья или животного материала;
- является данный экстракт жидким, густым или сухим, или это настойка;
- для стандартизованных экстрактов - содержание компонентов с известной терапевтической активностью;
- для количественных экстрактов - содержание компонентов (маркеров), которые определяют количественно;
- соотношение исходного материала и полученного экстракта (DER);
- использование при экстракции растворителя или растворителей;
- если необходимо, указывают, использовалось ли свежее растительные сырье или животный материал;
- если необходимо, экстракт «очищенный»;
- названия и количество всех вспомогательных веществ, в том числе стабилизаторов и антимикробных консервантов;
- если необходимо, содержание сухого остатка в процентах.

Жидкие экстракты

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Жидкие экстракты – жидкие лекарственные формы, в которых, обычно одна часть по массе или объему эквивалента одной части по массе исходного высушенного лекарственного сырья. Их стандартизируют, если необходимо, таким образом, чтобы они соответствовали требованиям по содержанию растворителя и, где возможно, действующих веществ.

ПРОИЗВОДСТВО

Жидкие экстракты могут быть изготовлены экстракцией лекарственного растительного сырья или животного материала спиртом (если не указан какой спирт, то имеется ввиду этиловый спирт) определенной концентрации или водой, или растворением густого или сухого экстрактов, полученных путем использования тех же растворителей в тех же концентрациях, что и при изготовлении жидкого экстракта, изготовленного путем прямой экстракции. При необходимости жидкие экстракты фильтруют.

При хранении может образовываться небольшой осадок при условии отсутствия существенного изменения состава.

Экстракты могут содержать соответствующие антимикробные консерванты.

ИСПЫТАНИЯ

Относительная плотность *(2.2.5)*. Значение относительной плотности должно соответствовать пределам, указанным в частной статье.

Содержание этанола *(2.9.10)*. Для спиртосодержащих жидких экстрактов проводят определение содержания этанола. Содержание этанола должно соответствовать пределам, указанным в частной статье.

Метанол и 2-пропанол *(2.9.11)*. В спиртосодержащих жидких экстрактах допускается содержание не более 0,05% *(об/об)* метанола и не более 0,05% *(об/об)* 2-пропанола, если нет других указаний в частной статье.

Сухой остаток. Содержание сухого остатка должно соответствовать пределам, указанным в частной статье.

2,00 г или 2,00 мл экстракта помещают в плоскодонную чашку или бюкс диаметром около 50 мм и высотой около 30 мм. Выпаривают досуха на водяной бане и сушат в сушильном шкафу при температуре от 100^0С до 105^0С в течение 3 ч. Охлаждают в эксикаторе над *фосфором (V) оксидом Р* и взвешивают. Результат выражают в массовых процентах или в граммах на литр.

\# **Тяжелые металлы** *(2.4.8, метод А).* Не более 0,01% (100 ppm).

К 1,0 мл жидкого экстракта прибавляют 1 мл *кислоты серной Р*, осторожно сжигают и прокаливают. К полученному остатку прибавляют при нагревании 5 мл раствора 615 г/л *аммония ацетата Р*, фильтруют через беззольный фильтр, промывают 5 мл *воды Р* и доводят объем фильтрата *водой Р* до 100 мл.

12 мл полученного раствора должны выдерживать испытание на тяжелые металлы. Эталон готовят с использованием *эталонного раствора свинца (1 ppm Pb) Р*.

В лекарственных средствах, содержащих железо в количестве 0,05% и более, определение тяжелых металлов проводят после отделения железа согласно указаниям в частной статье.

\# **Количественное определение.** Содержание определяемых веществ для жидких экстрактов выражают в процентах *(м/об)*.

ХРАНЕНИЕ

В воздухонепроницаемых контейнерах, в защищенном от света месте, если нет других указаний в частной статье.

МАРКИРОВКА

На этикетке дополнительно к вышеперечисленным требованиям указывают:

- если необходимо, содержание этанола в процентах *(об/об)* в готовом экстракте.

Густые экстракты

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Густые экстракты – мягкие лекарственные формы, изготовленные путем упаривания или частичного упаривания используемого растворителя.

Густые экстракты могут содержать подходящие антимикробные консерванты.

ИСПЫТАНИЯ

Сухой остаток. Содержание сухого остатка должно соответствовать пределам, указанным в частной статье.

2,00 г экстракта помещают в плоскодонную чашку или бюкс диаметром около 50 мм и высотой около 30 мм. Выпаривают досуха на водяной бане и сушат в сушильном шкафу при температуре от 100^{0}С до 105^{0}С в течение 3 ч. Охлаждают в эксикаторе над *фосфором (V) оксидом Р* и взвешивают. Результат выражают в массовых процентах.

Тяжелые металлы *(2.4.8, метод А).* Не более 0,01% (100 ppm).

К 1,00 г густого экстракта прибавляют 1 мл *кислоты серной Р*, осторожно сжигают и прокаливают. К полученному остатку прибавляют при нагревании 5 мл раствора 615 г/л *аммония ацетата Р,* фильтруют через беззольный фильтр, промывают 5 мл *воды Р* и доводят объем фильтрата водой Р до 100 мл.

12 мл полученного раствора должны выдерживать испытание на тяжелые металлы. Эталон готовят с использованием *эталонного раствора свинца (1 ppm Pb) Р*.

В лекарственных средствах, содержащих железо в количестве 0,05 % и более, определение тяжелых металлов проводят после отделения железа согласно указаниям в частной статье.

Количественное определение. Содержание определяемых веществ для густых экстрактов выражают в процентах *(м/м)*.

Растворители. Если необходимо, содержание и метод определения растворителя указывают в частной статье.

ХРАНЕНИЕ

В защищенном от света месте, если нет других указаний в частной статье.

Сухие экстракты

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Сухие экстракты – твердые лекарственные формы, получаемые удалением растворителя, использованного для их приготовления. Потеря в массе при высушивании или содержание воды в сухих экстрактах обычно не превышает 5% (*м/м*).

ИСПЫТАНИЯ

Вода. Если необходимо, содержание воды должно соответствовать пределам, указанным в частной статье.

Потеря в массе при высушивании *(2.2.32.)*. Значение потери в массе при высушивании должно соответствовать пределам, указанным в частной статье.

0,50 г измельченного в тонкий порошок экстракта помещают в плоскодонную чашку или бюкс диаметром около 50 мм и высотой около 30 мм и сушат в сушильном шкафу при температуре от 100^{0}С до 105^{0}С в течение 3 ч. Охлаждают в эксикаторе над *фосфором (V) оксидом Р* и взвешивают. Результат выражают в массовых процентах.

\# **Тяжелые металлы** *(2.4.8, метод А).* Не более 0,01% (100 ppm).

К 1,00г сухого экстракта прибавляют 1 мл *кислоты серной Р*, осторожно сжигают и прокаливают. К полученному остатку прибавляют при нагревании 5 мл раствора 615 г/л *аммония ацетата Р*, фильтруют через беззольный фильтр, промывают 5 мл *воды Р* и доводят объем фильтрата *водой Р* до 100 мл.

12 мл полученного раствора должны выдерживать испытание на тяжелые металлы. Эталон готовят с использованием *эталонного раствора свинца (1 ppm Pb) Р*.

В лекарственных средствах, содержащих железо в количестве 0,05 % и более, определение тяжелых металлов проводят после отделения железа согласно указаниям в частной статье.

\# **Количественное определение.** Содержание определяемых веществ для сухих экстрактов выражают в процентах *(м/м)*.

\# **Растворители.** Если необходимо, содержание и метод определения растворителя указывают в частной статье.

ХРАНЕНИЕ

В воздухонепроницаемых контейнерах, в защищенном от света месте.

Настойки

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Настойки – жидкие лекарственные средства, обычно изготавливают, используя одну часть лекарственного растительного сырья или животного материала и десять частей экстрагента или одну часть лекарственного растительного сырья или животного материала и пять частей экстрагента.

ПРОИЗВОДСТВО

Настойки изготавливают мацерацией или перколяцией, # или другими валидированными методами (например, реперколяцией, противоточной экстракцией), используя только спирт соответствующей концентрации для экстракции лекарственного растительного сырья или животного материала или разведением в спирте соответствующей концентрации густых или сухих экстрактов, при изготовлении которых использовали те же растворители и в тех же концентрациях, что и при изготовлении жидкого экстракта, изготовленного путем прямой экстракции.

\# Полученные извлечения обычно отстаивают не менее 2 суток при температуре не выше 10^{0}С до получения прозрачной жидкости и фильтруют. Настойки обычно прозрачные жидкости. При хранении может образовываться небольшой осадок при условии отсутствия существенного изменения состава.

Метод мацерации. Если нет других указаний, экстрагируемое лекарственное растительное сырье или животный материал измельчают до частиц определенного размера, тщательно смешивают с указанным экстрагентом и выдерживают в закрытом контейнере необходимое время. Остаток отделяют от экстрагента и, если необходимо, отжимают. В последнем случае обе жидкости объединяют.

Метод перколяции. Если необходимо, экстрагируемое сырье измельчают до частиц определенного размера, тщательно смешивают с порцией указанного экстрагента и оставляют на необходимое время. Затем переносят смесь в перколятор и медленно перколируют, следя за тем, чтобы сырье все время было полностью покрыто слоем экстрагента. Остаток может быть отжат, а полученную жидкость объединяют с перколятом.

ИСПЫТАНИЯ

Относительная плотность *(2.2.5)*. Значение относительной плотности должно соответствовать пределам, установленным в частной статье.

Содержание этанола *(2.9.10)*. Содержание этанола должно соответствовать пределам, указанным в частной статье.

Метанол и 2-пропанол *(2.9.11)*. В настойках допускается содержание не более 0,05% *(об/об)* метанола и не более 0,05% *(об/об)* 2-пропанола, если нет других указаний в частной статье.

Сухой остаток. Содержание сухого остатка должно соответствовать пределам, указанным в частной статье.

2,00 г или 2,00 мл настойки помещают в плоскодонную чашку или бюкс диаметром около 50 мм и высотой около 30 мм. Выпаривают досуха на водяной бане и сушат в сушильном шкафу при температуре от 100^{0}С до 105^{0}С в течение 3 ч. Охлаждают в эксикаторе над *фосфора (V) оксидом Р* и взвешивают. Результат выражают в массовых процентах или в граммах на литр.

Тяжелые металлы *(2.4.8, метод А).* Не более 0,001% (10 ppm), если нет других указаний в частной статье.

5,0 мл настойки выпаривают досуха, прибавляют 1 мл *кислоты серной Р*, осторожно сжигают и прокаливают. К полученному остатку прибавляют при нагревании 5 мл раствора 615 г/л *аммония ацетата Р*, фильтруют через беззольный фильтр, промывают 5 мл *воды Р* и доводят объем фильтрата *водой Р* до 50 мл.

12 мл полученного раствора должны выдерживать испытание на тяжелые металлы. Эталон готовят с использованием *эталонного раствора свинца (1 ppm Pb) Р*.

Количественное определение. Содержание определяемых веществ в настойках выражают в процентах *(м/об)*.

ХРАНЕНИЕ

В защищенном от света месте, если нет других указаний в частной статье.

МАРКИРОВКА

На этикетке дополнительно к вышеперечисленным требованиям указывают:

- для настоек, за исключением стандартизованных и количественных, указывают соотношение исходного сырья и экстрагента или исходного материала и готовой настойки;

-концентрацию этанола в процентах *(об/об)* в готовой настойке.

МЯГКИЕ ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА ДЛЯ МЕСТНОГО ПРИМЕНЕНИЯ

Требования данной статьи распространяются на все мягкие лекарственные средства для местного применения. К мягким лекарственным средствам, предназначенным для применения на определенных поверхностях тела или слизистых оболочках, должны быть предъявлены дополнительные требования в

соответствующих статьях «Ушные лекарственные средства», «Назальные лекарственные средства», «Лекарственные средства для ректального применения», «Глазные лекарственные средства» и «Лекарственные средства для вагинального применения», если нет других указаний в частных статьях.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Мягкие лекарственные средства для местного применения предназначены для местного или трансдермального высвобождения действующих веществ или для смягчающего или защитного действия. По внешнему виду они однородны.

Мягкие лекарственные средства для местного применения состоят из простой или сложной основы, в которой действующие вещества растворены или диспергированы в основе. В зависимости от состава, основа может влиять на активность лекарственного средства. Основа может состоять из природных или синтетических веществ и может представлять собой однофазную или многофазную систему. В зависимости от природы основы лекарственное средство может обладать как гидрофильными, так и гидрофобными свойствами. В их состав могут входить подходящие вспомогательные вещества, такие, как антимикробные консерванты, антиоксиданты, стабилизаторы, эмульгаторы, загустители и агенты, усиливающие проникновение действующего вещества.

Мягкие лекарственные средства для местного применения, предназначенные для применения на раневой поверхности, должны быть стерильными.

Контейнеры для мягких лекарственных средств для местного применения должны соответствовать требованиям статей *«Материалы, используемые для производства контейнеров» (3.1 и подразделы) и «Контейнеры» (3.2 и подразделы)*, если нет других указаний в частной статье.

Мягкие лекарственные средства для местного применения можно классифицировать как:

- мази;
- кремы;
- гели;
- пасты;
- линименты;
- припарки;
- пластыри медицинские.

В зависимости от структуры мази, кремы и гели характеризуются реологическими свойствами: определенной структурной вязкостью, псевдопластическими или пластическими и тиксотропными свойствами. Пасты обладают способностью к расширению.

ПРОИЗВОДСТВО

При разработке мягких лекарственных средств для местного применения, в состав которых входят антимикробные консерванты, уполномоченному органу представляют данные, подтверждающие эффективность выбранных консервантов. Метод определения и критерии оценки эффективности консервантов должны соответствовать требованиям статьи *«Эффективность антимикробных консервантов» (5.1.3).*

При производстве, упаковке, хранении и реализации мягких лекарственных средств для местного применения предпринимают меры, обеспечивающие микробиологическую чистоту в соответствии с требованиями статьи *«Микробиологическая чистота лекарственных средств» (5.1.4).*

Стерильные мягкие лекарственные средства для местного применения изготавливают с использованием материалов и методов, обеспечивающих

стерильность и предотвращающих загрязнение лекарственных средств и развитие микроорганизмов в соответствии с требованиями статьи *«Методы приготовления стерильных продуктов» (5.1.1).*

В процессе производства мягких лекарственных средств для местного применения предпринимают меры, обеспечивающие определенные реологические свойства. При необходимости выполняют следующие испытания: пенетрометрию *(2.9.9),* определение вязкости *(2.2.10)*, и подходящее испытание, позволяющее оценить высвобождение действующего вещества или веществ. В процессе производства мягких лекарственных средств для местного применения, содержащие действующее вещество или вещества, которые не растворяются в основе (например, эмульсии или суспензии), предпринимают меры, обеспечивающие однородность лекарственного средства. При производстве мягких лекарственных средств для местного применения, содержащих диспергированные частицы, предпринимают меры по обеспечению и контролю необходимого размера частиц в соответствии с назначением данного лекарственного средства.

ИСПЫТАНИЯ

Масса или объем содержимого контейнера *(2.9.28)*. Мягкие лекарственные средства для местного применения, содержащие одну дозу лекарственного средства, должны выдерживать данное испытание.

Стерильность *(2.6.1)*. Если на этикетке указано, что лекарственное средство стерильно, оно должно выдерживать испытание на стерильность.

ХРАНЕНИЕ

Если в состав лекарственного средства входит вода или другие испаряющиеся вещества, его хранят в воздухонепроницаемых контейнерах, если нет других указаний в частной статье. Если лекарственное средство стерильно, его хранят в стерильных, воздухонепроницаемых контейнерах.

МАРКИРОВКА

На этикетке должны быть указывают:

- название всех добавленных антимикробных консервантов;
- для стерильных лекарственных средств – указание о стерильности.

Мази

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Мазь состоит из однофазной основы, в которой диспергированы твердые вещества или жидкости.

Гидрофобные мази

Гидрофобные мази могут адсорбировать лишь небольшое количество воды. Основы, которые используют для приготовления таких мазей, представляют собой твердые, жидкие и легкие жидкие парафины, растительные масла, животные жиры, синтетические глицериды, воски и жидкие полиалкилсилоксаны.

Водоэмульсионные мази

Водоэмульсионные мази могут адсорбировать большое количество воды и образуют эмульсии типа вода/масло или масло/вода, в зависимости от природы эмульгатора. Эмульсии вода/масло образуются при использовании таких эмульгаторов как спирты шерстного воска, сложные эфиры, моноглицериды и жирные спирты. Эмульсии масло/вода образуются при использовании таких эмульгаторов как жирные спирты, полисорбаты, цетостеариловый эфир макрогола

или сложные эфиры жирных кислот с макроголами могут быть использованы для этих целей. Основа этих мазей такая же, как при приготовлении гидрофобных мазей.

Гидрофильные мази

Гидрофильные мази представляют собой лекарственные средства, имеющие основу, которая смешивается с водой. В качестве основы чаще всего используют смеси жидких и твердых макроголов (полиэтиленгликолей). Эти мази могут содержать некоторое количество воды.

Кремы

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Кремы представляют собой многофазные лекарственные средства, состоящие из липофильной фазы и водной фазы.

Липофильные кремы

В липофильных кремах в качестве постоянной фазы используют липофильную фазу. Они содержат эмульгаторы типа вода/масло, такие как спирты шерстного воска, эфиры сорбитана и моноглицериды.

Гидрофильные кремы

В гидрофильных кремах в качестве постоянной фазы используют водную фазу. Они содержат эмульгаторы типа масло/вода, такие как натриевые или троламиновые мыла, сульфатные жирные спирты, полисорбаты и полиоксильные жирные кислоты или эфиры высших жирных спиртов смешанные, при необходимости, с водно-жировыми эмульгаторами.

Гели

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Гели состоят из жидкостей, превращенных в гели с помощью гелеобразователей.

Липофильные гели

Липофильные гели (олеогели) представляют собой лекарственные средства, состоящие из основы, содержащей вазелиновое масло с полиэтиленом или жирными маслами, и гелеобразователей, таких как кремний диоксид коллоидный, алюминиевое или цинковое мыло.

Гидрофильные гели

Гидрофильные гели (гидрогели) представляют собой лекарственные средства, приготовленные на основах, состоящих из воды, глицерина или пропиленгликоля, и гелеобразователей, таких как крахмал, производные целлюлозы, карбомеры и магний-алюминиевые силикаты.

Пасты

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Пасты представляют собой мягкие лекарственные средства для местного применения, содержащие значительное количество твердых веществ (# обычно более 25% *м/м*), диспергированных в основе.

Линименты

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Линименты – мягкие лекарственные средства для местного применения, плавящиеся при температуре тела. К линиментам могут быть отнесены мази, кремы, гели и пасты, характеризующиеся этим признаком.

Припарки

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Припарки состоят из гидрофильной, сохраняющей высокую температуру, основы, в которой диспергированы твердые или жидкие действующие вещества. Как правило, припарки распределяют на подходящем перевязочном материале и нагревают перед наложением на кожу.

НАЗАЛЬНЫЕ ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Назальные лекарственные средства - жидкие, мягкие или твёрдые лекарственные средства, предназначенные для введения в носовую полость с целью получения системного или местного действия. Они содержат одно или более действующих веществ. Назальные лекарственные средства не должны оказывать раздражающего и другого неблагоприятного воздействия на слизистую носа и ее волоски. Водные назальные лекарственные средства обычно изотоничны и могут содержать вспомогательные вещества, например, для обеспечения вязкости, создания или стабилизации pH, повышения растворимости действующего вещества или обеспечения стабильности лекарственного средства.

Назальные лекарственные средства выпускают в контейнерах, содержащих одну или несколько доз лекарственного средства, снабженных, если необходимо, приспособлением, которое обеспечивает удобство применения и предотвращает загрязнение.

Если нет других указаний в частной статье, водные назальные лекарственные средства в многодозовых контейнерах содержат подходящий антимикробный консервант в необходимой концентрации, за исключением лекарственных средств, обладающих достаточным антимикробным действием.

Контейнеры для назальных лекарственных средств должны соответствовать требованиям статей *«Материалы, используемые для производства контейнеров» (3.1 и подразделы) и «Контейнеры» (3.2 и подразделы),* если нет других указаний в частной статье.

Назальные лекарственные средства можно классифицировать как:
- назальные капли и жидкие назальные спреи, аэрозоли;
- назальные порошки;
- назальные мягкие лекарственные средства;
- назальные промывки;
- назальные палочки.

ПРОИЗВОДСТВО

При разработке назальных лекарственных средств, в состав которых входят антимикробные консерванты, уполномоченному органу представляют данные, подтверждающие эффективность выбранных консервантов. Метод определения и критерии оценки эффективности консервантов должны соответствовать требованиям статьи *«Эффективность антимикробных консервантов» (5.1.3).*

При производстве, упаковке, хранении и реализации назальных лекарственных средств предпринимают меры, обеспечивающие микробиологическую чистоту в соответствии с требованиями статьи *«Микробиологическая чистота лекарственных средств» (5.1.4).*

Стерильные назальные лекарственные средства производят с использованием материалов и методов, обеспечивающих стерильность и предотвращающих

загрязнение лекарственных средств и развитие микроорганизмов в соответствии с требованиями статьи *«Методы приготовления стерильных продуктов» (5.1.1).*

При производстве назальных лекарственных средств, содержащих диспергированные частицы, предпринимают меры, обеспечивающие необходимый размер частиц и его контроль.

ИСПЫТАНИЯ

Стерильность *(2.6.1).* Если на этикетке указано, что лекарственное средство стерильно, оно должно выдерживать испытание на стерильность.

ХРАНЕНИЕ

Если лекарственное средство стерильно, хранят в стерильных, воздухонепроницаемых контейнерах с контролем первого вскрытия, если нет других указаний в частной статье.

МАРКИРОВКА

На этикетке указывают:

- название всех добавленных антимикробных консервантов;
- стерильно, если необходимо.

Назальные капли и жидкие назальные спреи

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Назальные капли и жидкие назальные спреи - растворы, эмульсии или суспензии, предназначенные для закапывания или распыления в носовую полость.

Эмульсии могут расслаиваться, однако быстро восстанавливаются при взбалтывании.

Суспензии могут образовывать осадок, который быстро ресуспендируется при взбалтывании, образуя суспензию достаточно стабильную, чтобы обеспечить однородность лекарственного средства при дозировании.

Назальные капли обычно выпускают в многодозовых контейнерах, снабженных подходящей насадкой.

Жидкие назальные спреи выпускают в контейнерах с дозирующим устройством или в контейнерах под давлением, снабженных подходящей насадкой, а также с дозирующим клапаном или без него. Если спреи выпускают в контейнерах под давлением, они должны выдерживать требования статьи *«Лекарственные средства, находящиеся под давлением».*

Размер распыленных капелек должен быть таким, чтобы обеспечивать их осаждение в полости носа.

ИСПЫТАНИЯ

Если нет других указаний в частных статьях, назальные капли и дозированные спреи, выпускаемые в однодозовых контейнерах и предназначенные для системного действия, должны выдерживать следующие испытания.

Однородность массы. Назальные капли, представляющие собой растворы, должны выдерживать следующее испытание: освобождают каждый из 10 контейнеров как можно полнее и взвешивают содержимое каждого контейнера, определяют среднюю массу содержимого. Масса содержимого не более чем двух контейнеров может отклоняться более чем на 10% от средней массы, и масса содержимого ни одного контейнера не должна отклоняться более чем на 20 % от средней массы.

Дозированные назальные спреи, представляющие собой растворы, должны

выдерживать следующее испытание: один раз нажимают на клапан и высвободившееся содержимое отбрасывают. Спустя не менее 5 с нажимают на клапан и высвободившееся содержимое снова отбрасывают. Повторяют эту операцию еще три раза. Взвешивают контейнер, нажимают на клапан и снова взвешивают контейнер. По разнице вычисляют массу высвободившегося содержимого. Повторяют эту операцию еще для девяти контейнеров. Масса содержимого не более чем двух контейнеров может отклоняться более чем на 25 % от средней массы, но не более чем на 35%.

Однородность содержания *(2.9.6)*. Назальные капли, представляющие собой суспензии или эмульсии, должны выдерживать следующее испытание: освобождают каждый контейнер как можно полнее и определяют содержание действующего вещества для каждого контейнера. Лекарственное средство должно выдерживать испытание на однородность содержания (тест В).

Однородность дозирования. Дозированные назальные спреи, представляющие собой суспензии или эмульсии, должны выдерживать следующее испытание. Используют прибор, позволяющий количественно удерживать дозу после нажатия распылительного устройства.

Встряхивают контейнер в течение 5 с, выпускают дозу и отбрасывают. Спустя не менее 5 с снова встряхивают контейнер в течение 5 с, выпускают дозу и отбрасывают. Повторяют указанную операцию три раза. Спустя 2 с нажимают на распылительное устройство, направляя дозу назального спрея в собирающий сосуд. Содержимое собирающего сосуда путем последовательных промываний растворителем, указанным в частной статье, объединяют и определяют содержание действующего вещества в объединенном растворе.

Повторяют вышеописанную процедуру еще для девяти контейнеров.

Если нет других указаний в частной статье, лекарственное средство удовлетворяет требованиям, если содержание действующего вещества в дозе не более чем одного контейнера не укладывается в пределы от 75% до 125%, но не выходит за пределы от 65% до 135% от среднего значения.

Если содержание действующего вещества в дозе двух или трех отдельных контейнеров не укладываются в пределы от 75% до 125%, но укладывается в пределы от 65% до 135%, повторяют испытание ещё для 20 контейнеров. Лекарственное средство выдерживает испытание, если содержание действующего вещества в дозе не более чем трех контейнеров не укладывается в пределы от 75% до 125%, но не выходит за пределы от 65% до 135% от среднего значения.

Назальные порошки

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Назальные порошки - порошки, предназначенные для введения в носовую полость посредством подходящего приспособления. Они должны выдерживать требования статьи *«Порошки для наружного применения»*.

Размер частиц, которые осаждаются в носовых полостях, подтверждают соответствующими методами определения размера частиц.

Назальные мягкие лекарственные средства

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Мягкие назальные лекарственные средства должны выдерживать требования статьи «*Мягкие лекарственные средства для местного применения»*.

Контейнер должен иметь подходящее приспособление для нанесения

лекарственного средства.

Назальные промывки

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Назальные промывки обычно представляют собой водные изотонические растворы, предназначенные для очистки носовых полостей.

Назальные промывки, предназначенные для применения на поврежденных участках носа или используемые перед проведением хирургических операций, должны быть стерильными.

ИСПЫТАНИЯ

Определение массы или объёма содержимого контейнера *(2.9.28).* Назальные промывки, выпускаемые в однодозовых контейнерах, должны выдерживать испытания на массу или объем содержимого контейнера.

Назальные палочки

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Назальные палочки должны выдерживать требования статьи «*Палочки*».

ПАЛОЧКИ

К палочкам могут быть предъявлены дополнительные требования, указанные в других статьях, например *«Назальные лекарственные средства».*

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Палочки – твердые лекарственные средства, предназначенные для местного применения. Они имеют форму конического стержня и состоят из одного или более действующих веществ, распределенных в соответствующей основе, которая распадается или расплавляется при температуре тела. Палочки, которые вставляют в уретру и которые помещают в раны, должны быть стерильными.

При производстве, упаковке, хранении и реализации палочек предпринимают меры, обеспечивающие микробиологическую чистоту в соответствии с требованиями статьи *«Микробиологическая чистота лекарственных средств» (5.1.4).*

Стерильные палочки производят с использованием материалов и методов, обеспечивающих стерильность и предотвращающих загрязнение лекарственных средств и развитие микроорганизмов в соответствии с требованиями статьи *«Методы приготовления стерильных продуктов» (5.1.1).*

Производство палочек обеспечивает однородность массы и/или однородность содержания действующего вещества.

ИСПЫТАНИЯ

Стерильность *(2.6.1).* Палочки, которые вставляют в уретру и которые помещают в раны, должны выдерживать испытание на стерильность.

МАРКИРОВКА

На этикетке указывают:

- количество действующего вещества, содержащегося в палочке;
- «стерильно», если необходимо.

ПЕНЫ МЕДИЦИНСКИЕ

К пенам медицинским могут быть предъявлены дополнительные требования, указанные в других статьях, например *«Лекарственные средства для ректального применения»*, *«Лекарственные средства для вагинального применения»* и *«Жидкие лекарственные средства для наружного применения».*

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Содержащие лекарственные вещества пены, состоят из большого объёма диспергированного в жидкости газа и содержат обычно одно или более действующих веществ, поверхностно-активные вещества, обеспечивающие образование пены, а также другие вспомогательные вещества. Пены медицинские обычно предназначаются для нанесения на кожные покровы или слизистые оболочки. Пены медицинские обычно образуются непосредственно во время применения из жидкого лекарственного средства, находящегося в контейнере под давлением. Контейнер должен быть снабжен устройством, состоящим из клапана и насадкой нажимного типа, обеспечивающим высвобождение пены.

Пены медицинские, предназначенные для использования на сильно поражённых участках кожных покровов или на больших открытых ранах, должны быть стерильными.

Пены медицинские, выпускаемые в контейнере под давлением, должны соответствовать требованиям статьи «*Лекарственные средства, находящиеся под давлением».*

ПРОИЗВОДСТВО

Стерильные пены медицинские производят с использованием материалов и методов, обеспечивающих их стерильность и исключающих возможность их последующего загрязнения и развитие микроорганизмов в соответствии с требованиями статьи «*Методы приготовления стерильных продуктов» (5.1.1)*.

ИСПЫТАНИЯ

Относительная плотность пены медицинской. Контейнер выдерживают при температуре около 25°С в течение, как минимум, 24 ч. Следя за тем, чтобы не нагреть контейнер, устанавливают на насадку нажимного типа жесткую трубку длиной 70-100 мм с внутренним диаметром отверстия около 1 мм. Встряхивают контейнер для получения однородного содержимого, выпускают и отбрасывают 5-10 мл пены. Взвешивают плоскодонную чашу вместимостью около 60 мл и высотой около 35 мм. Помещают конец жесткой трубки, установленной на насадке нажимного типа в угол ёмкости, нажимают насадку и равномерно, круговыми движениями, заполняют емкость. После того как пена расширится, сглаживают ее уровень, удалив излишки пены подходящим плоским предметом, например предметным стеклом. Взвешивают. Определяют массу такого же объема *воды Р*, наполнив ту же чашу *водой Р*.

Относительную плотность пены медицинской определяют по формуле:

$$\frac{m}{e},$$

где:

m - масса навески испытуемого образца пены, г;

e - масса такого же объема *воды Р*, г.

Проводят три определения. Ни одно из индивидуальных значений не должно отклоняться более чем на 20% от среднего значения.

Время расширения. Прибор (Рис. 1105.-1) состоит из бюретки вместимостью 50 мл, внутренним диаметром 15 мм и ценой деления 0,1 мл, снабженной запорным краном с одним отверстием диаметром 4 мм. Отметка, соответствующая 30 мл, должна находиться на расстоянии не менее 210 мм от оси запорного крана. Нижняя часть бюретки соединена при помощи пластмассовой трубки длиной не более 50 мм и с внутренним диаметром 4 мм с пенообразующим контейнером, оборудованным подходящей для данного соединения насадкой нажимного типа. Контейнер выдерживают при температуре около 25°C в течение, как минимум, 24 ч. Следя за тем, чтобы не нагреть, встряхивают контейнер для получения однородного содержимого, выпускают и отбрасывают 5-10 мл пены. Соединяют насадку и носик бюретки. Открывают запорный кран, нажимают на насадку и выпускают одну дозу пены объемом около 30 мл. Закрывают запорный кран и одновременно включают хронометр. Наблюдают за объёмом пены в бюретке, каждые 10 с отмечают увеличение объёма пены до тех пор, пока не будет достигнут максимальный объём. Проводят три определения. Время достижения максимального объема в каждом определении не должно превышать 5 мин.

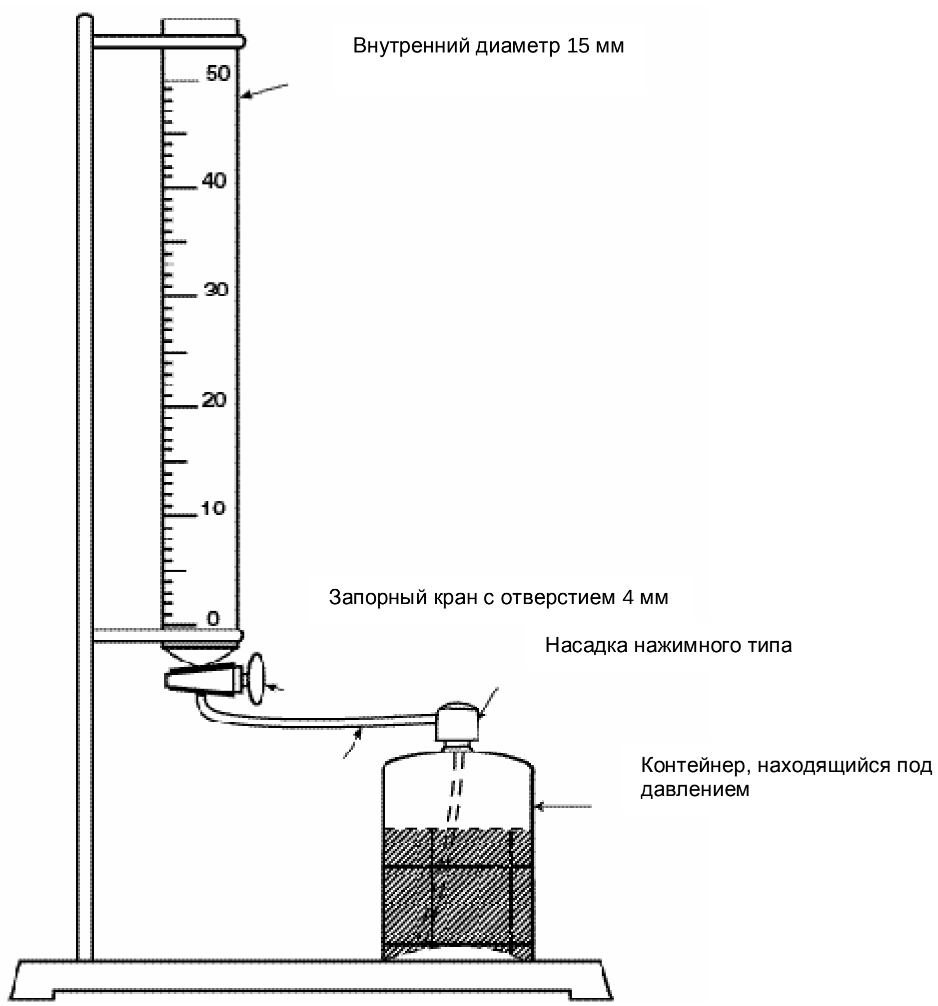


Рисунок 1105.-1. – Прибор для определения времени расширения.

Стерильность *(2.6.1).* Если на этикетке указано, что лекарственное средство стерильно, оно должно выдерживать испытание на стерильность.

МАРКИРОВКА

На этикетке указывают «стерильно», если необходимо.

ПОРОШКИ ДЛЯ НАРУЖНОГО ПРИМЕНЕНИЯ

Требования данной статьи не распространяются на лекарственные средства, предназначенные для использования в ветеринарии, если нет других указаний в частной статье.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Порошки для наружного применения – лекарственные средства, состоящие из твердых отдельных сухих частиц различной степени измельчения, обладающие свойствами сыпучести. Они содержат одно или более действующих веществ со вспомогательными веществами или без них и, если необходимо, красители, разрешенные к медицинскому применению. Порошки для наружного применения могут содержать одну или несколько доз лекарственного средства.

Порошки, предназначенные для наложения на большие открытые раны или на сильно поврежденные участки кожи, должны быть стерильными.

Многодозовые порошки упаковывают в контейнеры, снабженные механическим приспособлением для распыления, или в контейнеры под давлением.

Порошки, выпускаемые в контейнерах под давлением, должны соответствовать требованиям статьи «*Лекарственные средства, находящиеся под давлением».*

Контейнеры для порошков для наружного применения должны соответствовать требованиям статей *«Материалы, используемые для производства контейнеров» (3.1 и подразделы) и «Контейнеры» (3.2 и подразделы),* если нет других указаний в частной статье.

ПРОИЗВОДСТВО

При производстве порошков для наружного применения предусматривают меры, обеспечивающие необходимый размер частиц.

При производстве, упаковке, хранении и реализации порошков для применения предпринимают меры, обеспечивающие микробиологическую чистоту в соответствии с требованиями статьи *«Микробиологическая чистота лекарственных средств» (5.1.4).*

Стерильные порошки для наружного применения производят с использованием материалов и методов, обеспечивающих стерильность и предотвращающих загрязнение лекарственных средств и развитие микроорганизмов в соответствии с требованиями статьи *«Методы приготовления стерильных продуктов» (5.1.1).*

ИСПЫТАНИЯ

Измельченность. Измельченность порошка определяют ситовым анализом *(2.9.12)* или другим подходящим методом, указанным в частной статье.

Однородность содержания *(2.9.6)*. Порошки для наружного применения в однодозовых контейнерах с содержанием действующего вещества менее 2 мг или менее 2% от общей массы содержимого должны выдерживать испытание на однородность содержания действующего вещества в единице дозированного лекарственного средства (тест В), если нет других указаний в частной статье. Если лекарственное средство содержит более одного действующего вещества, это требование распространяется только на те вещества, содержание которых соответствуют выше указанным условиям.

Однородность массы *(2.9.5).* Порошки для наружного применения в однозовых контейнерах должны выдерживать испытание на однородность массы для единицы дозированного лекарственного средства. Испытание однородности массы не требуется, если испытание на однородность содержания предусмотрено для всех действующих веществ.

Стерильность *(2.6.1).* Если на этикетке указано, что лекарственное средство стерильно, оно должно выдерживать испытание на стерильность.

МАРКИРОВКА

На этикетке указывают:

- лекарственное средство предназначено для наружного применения;
- «стерильно», если необходимо.

ПОРОШКИ ДЛЯ ОРАЛЬНОГО ПРИМЕНЕНИЯ

Требования к порошкам, используемых для приготовления растворов или суспензий для орального применения, приведены в статье «Жидкие лекарственные средства для орального применения». Требования данной статьи не распространяются на порошки для орального применения, используемые в ветеринарии, если нет других указаний в частной статье.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Порошки для орального применения – лекарственные средства, состоящие из твердых отдельных сухих частиц различной степени измельчения, обладающие свойствами сыпучести. Они содержат одно или более действующих веществ со вспомогательными веществами или без них и, если необходимо, красители, разрешенные к медицинскому применению, и ароматизаторы. Порошки обычно принимают с водой или другой подходящей жидкостью. Их можно также глотать непосредственно. Порошки могут содержать одну или несколько доз лекарственного средства.

Контейнеры для порошков для орального применения, должны соответствовать требованиям статей *«Материалы, используемые для производства контейнеров» (3.1 и подразделы)* и *«Контейнеры» (3.2 и подразделы),* если нет других указаний в частной статье.

Каждую дозу порошка из многодозового контейнера отбирают с помощью соответствующего приспособления для отмеривания предписанного количества. Каждая доза однодозового порошка должна быть упакована в отдельную упаковку, например в пакетик или флакон.

ПРОИЗВОДСТВО

При производстве порошков для орального применения предпринимают меры, обеспечивающие необходимый размер частиц.

При производстве, упаковке, хранении и реализации порошков для орального применения предпринимают меры, обеспечивающие микробиологическую чистоту в соответствии с требованиями статьи *«Микробиологическая чистота лекарственных средств» (5.1.4).*

ИСПЫТАНИЯ

Однородность содержания *(2.9.6)*. Порошки для орального применения в однодозовых контейнерах с содержанием действующего вещества менее 2 мг или менее 2% от общей массы содержимого должны выдерживать испытание на однородность содержания действующего вещества в единице дозированного лекарственного средства (тест В), если нет других указаний в частной статье. Если лекарственное средство содержит более одного действующего вещества, это требование распространяется только на те вещества, содержание которых соответствуют выше указанным условиям.

Однородность массы *(2.9.5).* Порошки для орального применения в однодозовых контейнерах должны выдерживать испытание на однородность массы для единицы дозированного лекарственного средства. Испытание на однородность массы не требуется, если испытание на однородность содержания предусмотрено для всех действующих веществ.

Однородность массы дозы в многодозовых контейнерах *(2.9.27).* Порошки для орального применения в многододозовых контейнерах должны выдерживать испытание на однородность массы дозы, высвобожденной из многодозового контейнера.

ХРАНЕНИЕ

Если лекарственное средство содержит летучие вещества или содержимое должно быть защищено, хранят в воздухонепроницаемом контейнере, если нет других указаний в частной статье.

Порошки «шипучие»

Порошки «шипучие» - однодозовые или многодозовые порошки, содержащие главным образом кислоты и карбонаты или гидрокарбонаты, которые при наличии воды быстро вступают в реакцию с выделением углекислого газа. Они предназначены для растворения или диспергирования в воде перед применением.

ХРАНЕНИЕ

Хранят в воздухонепроницаемых контейнерах, если нет других указаний в частной статье.

ПРОДУКТЫ ФЕРМЕНТАЦИИ

Эта общая статья касается побочных (непрямых) генетических продуктов, получаемых посредством ферментации. Она не имеет отношения к:

- статьям в Фармакопее касающимся вакцин для медицинского применения;

- продуктам, производным от перевиваемых клеточных линий животного или человеческого происхождения;

- непосредственным генетическим продуктам, которые являются результатом транскрипции гена и преобразования информации нуклеиновой

кислоты в протеин, вне зависимости от того, подлежат эти протеины модификации после преобразования или нет;

- полусинтетическим продуктам, получаемым из продуктов ферментации и продуктов, получаемых посредством биокаталитического преобразования;

- цельным концентратам или сырьевым ферментативным продуктам.

Эта статья содержит общие требования по разработке и производству продуктов ферментации. Эти требования не являются всеобъемлющими для каждого конкретного случая. Дополнительные требования к предписаниям данной статьи могут быть изложены в частной статье или компетентными органами.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Исходя из задач данной статьи, продукты ферментации определяются, как активные или неактивные фармацевтические вещества, получаемые в процессе контролируемой ферментации, как непрямые продукты гена. Они представлены первичными или вторичными метаболитами микроорганизмов типа бактерий, дрожжей, грибов и микроскопических морских водорослей, модифицированными либо не модифицированными в соответствии с традиционными технологическими процессами, либо в соответствии с технологиями рекомбинантной ДНК. Такие метаболиты включают витамины, аминокислоты, антибиотики, алкалоиды и полисахариды.

Они могут быть получены в ходе ферментативного процесса по производству одной партии либо в ходе непрерывного ферментативного процесса, которые сопровождаются такими технологическими процедурами, как экстракция, концентрирование, очистка и изолирование.

ПРОИЗВОДСТВО

Производство должно быть основано на воспроизводимом процессе, который прошел процедуру подтверждения. Степень воспроизводимости определяется по критическому (лимитирующему) этапу соответствующего технологического процесса.

ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРООРГАНИЗМА-ПРОИЗВОДИТЕЛЯ

Должна документироваться история развития микроорганизма, используемого в производственном процессе. Характеристика микроорганизма может включать в себя определение его фенотипа, макроскопических и микроскопических признаков, биохимических свойств. Если необходимо, проводится определение генотипа микроорганизма и его молекулярных генетических свойств.

ПРОЦЕСЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МАТОЧНОЙ СЕРИИ КУЛЬТУР МИКРООРГАНИЗМОВ

Контрольный банк культур микроорганизмов – это гомогенная суспензия или лиофилизат оригинальных микроорганизмов, распределенных по индивидуальным емкостям для хранения. Жизнеспособность и производительность микроорганизмов при выбранных условиях хранения и их пригодность для ввода в производственный процесс после хранения должны быть очевидными и надлежащим образом подтвержденными.

Промежуточный контрольный банк культур микроорганизмов, который может быть получен с использованием маточной серии культур микроорганизмов, используется для создания рабочего банка культур микроорганизмов.

Рабочий банк культур микроорганизмов – это гомогенная суспензия или лиофилизат микроорганизмов, полученных из контрольного банка культур микроорганизмов, распределенный в равных объемах по индивидуальным емкостям для хранения (например, в жидком азоте).

Производство может происходить в виде одного законченного цикла или быть непрерывным производственным процессом, который может заканчиваться при определенных условиях.

Все емкости с культурами микроорганизмов хранятся в одинаковых условиях. После хранения, ампулы, флаконы не возвращаются обратно.

ПРОЦЕССЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СТУПЕНЬЧАТОГО РОСТА КУЛЬТУР МИКРООРГАНИЗМОВ

Содержимое емкости рабочего банка культур микроорганизмов (при необходимости, после ресуспензирования) используется для приготовления прививочного материала в подходящую питательную среду. После соответствующего периода роста, культуры используются для инициации ферментативного процесса (если это необходимо, после этапа прекультивирования в преферментаторе). Условия, которые необходимы на каждой стадии процесса, строго определяются и должны выполняться при каждом производственном цикле.

КОНТРОЛЬ ИЗМЕНЕНИЙ

Если в ходе производственного процесса происходят какие-либо изменения, которые существенным образом могут изменить профили примесей продукта, критические этапы производства, связанные с этими изменениями, должны утверждаться повторно.

Если существенное изменение затрагивает сам микроорганизм, используемый для производства, и влечет за собой существенное изменение в профиле примесей продукта, все критические этапы производственного процесса, связанные с этим изменением, в частности процедура очистки и изолирования, также утверждаются повторно.

Согласование произошедших изменений включает в себя подтверждение того, что новые примеси в продукте, появившиеся вследствие изменения, могут соответствующим образом контролироваться в ходе производственного процесса. Если возникает необходимость в дополнительных или альтернативных испытаниях, то они должны вводится с определенными ограничениями. Если изменение в процессе или в микроорганизмах приводит к увеличению уровня уже присутствующих примесей, то приемлемость такого увеличения должна быть четко установлена.

При замене контрольного банка культур микроорганизмов, критические этапы производственного процесса должны повторно согласовываться таким образом, чтобы было очевидно, что никаких отрицательных изменений в качестве продукта и его соответствии стандарту не произошло. Если в процесс вводится видоизмененный или новый микроорганизм, то особое внимание необходимо обратить на изменения в профиле примеси продукта.

СЫРЬЕ

Сырье, используемое на всех этапах процесса ферментации и/или последующих этапах обработки должно иметь соответствующее качество. Оно проверяется на соответствие письменным спецификациям.

Уровни биологической нагрузки в среде или входящем для аэрации воздухе уменьшаются до уровня, гарантирующего, что в случае возникновения микробной контаминации не возникнет негативного воздействия на качество, чистоту и безопасность продукта. Добавка таких компонентов, как питательные вещества, прекурсоры и субстраты во время ферментации проводится в асептических условиях.

КОНТРОЛЬ В ПРОЦЕССЕ ФЕРМЕНТАЦИИ

Контроль в ходе процесса ферментации осуществляется для того, чтобы гарантировать постоянство условий во время самого процесса и последующих этапов обработки, а также для обеспечения качества изолированного продукта. Особое внимание должно быть уделено способности используемых методов контроля обнаружить любого микробное загрязнение, которое может отрицательно сказаться на качестве, чистоте и безопасности продукта.

Производственные условия могут контролироваться путем выполнения соответствующих процедур, например, посредством регулирования и проверки:

– температуры,

– значения pH,

– нормы аэрации,

– скорости перемешивания,

– давления,

а также посредством контроля концентрации требуемого продукта.

ОБРАБОТКА НА ВЫХОДЕ

В конце ферментации, микроорганизм-продуцент инактивируется или удаляется. Дальнейшая обработка проводится с целью удаления остатков питательной среды до приемлемого уровня, чтобы гарантировать постоянное качество требуемого продукта.

Могут использоваться различные процессы очистки, например, обработка активированным углем, ультрафильтрация и экстракция растворителем. Необходимо убедиться, что выбранный процесс или процедура уменьшает до минимума или удаляет:

– остатки микроорганизма-продуцента, питательной среды, субстратов и прекурсоров,

– нежелательные продукты трансформации субстратов и прекурсоров.

Если необходимо, соответствующие испытания выполняются либо в ходе процесса ферментации, либо на изолированном продукте ферментации.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ, ИСПЫТАНИЯ И ПРОБЫ

Требования и специальные методы исследования, которым продукт должен соответствовать в течение всего периода проверки качества, указываются в конкретных частных статьях.

ХРАНЕНИЕ

Условия хранения указывают в частной статье.

МАРКИРОВКА

Требования к маркировке указывают в частных статьях.

ПРОДУКТЫ, КОТОРЫЕ МОГУТ БЫТЬ ПЕРЕНОСЧИКАМИ ГУБЧАТОЙ ЭНЦЕФАЛОПАТИИ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

К продуктам, которые могут быть переносчиками губчатой энцефалопатии относятся продукты, полученные из тканей или секретов животных, которые могут быть переносчиками губчатой энцефалопатии. Эта статья относится ко всем субстанциям или препаратам:

– полученным от таких животных,

– в состав которых входят продукты, полученные от таких животных,

– в производстве которых использовались такие продукты, например в качестве наполнителей, исходных материалов или реактивов.

ПРОИЗВОДСТВО

Производство осуществляется в соответствии с разделом *«Минимизация риска передачи губчатой энцефалопатии животного происхождения через лекарственные средства»* (5.2.8).

РАДИОАКТИВНЫЕ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ ПРЕПАРАТЫ

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Данная общая статья распространяется на следующие радиоактивные фармацевтические препараты:

– радиоактивное лекарственное средство: любое лекарственное средство, готовое к медицинскому применению, которое содержит один или более радионуклидов (радиоактивные изотопы).

– изотопный генератор: любая система, включающая установленный материнский радионуклид, от которого производится дочерний радионуклид, удаляемый элюированием или любым другим методом и используемый для приготовлении радиоактивного лекарственного средства,

– комплект для приготовления радиоактивного лекарственного средства: используется при заключительном приготовлении радиоактивного лекарственного средства, обычно перед его применением,

– радиоактивный фармацевтический прекурсор: радионуклид, используемый для радиоактивной метки другого вещества имеющего первичное назначение.

Нуклид – разновидность атома, характеризующегося числом протонов и нейтронов в его ядре (т.е. его атомным номером Z, и массовым числом A), а также его потенциалом ядерной энергии. Изотопы элемента – это нуклиды с одинаковым атомным номером, но с различным массовым числом. Нуклиды, содержащие нестабильные комбинации протонов и нейтронов, могут преобразовываться спонтанно в устойчивые или другие нестабильные комбинации протонов и нейтронов с постоянной статистической вероятностью. Такие нуклиды являются радиоактивными и называются радионуклидами. Начальный нестабильный нуклид называется материнским радионуклидом, а конечный нуклид – дочерним нуклидом.

Радиоактивный распад или преобразование может повлечь излучение заряженных частиц, электронный захват (ЭЗ) или изомерный переход (ИП). Заряженные частицы, исходящие от ядра, могут быть альфа-частицами (ядрами гелия с массовым числом 4) или бета-частицами (отрицательно заряженные – электроны или положительно заряженные – позитроны). Эмиссия заряженных частиц от ядра может сопровождаться гамма-излучением. Гамма-излучение также происходит в процессе изомерного перехода. Эта эмиссия может быть частично заменена выбросом электронов (конверсионные электроны). Данное явление, подобно процессу электронного захвата, влечет вторичное рентгеновское излучение из-за реорганизации электронов в атоме. Вторичная эмиссия может быть частично заменена выбросом электронов (оже-электронов). Радионуклиды с дефицитом нейтронов могут распадаться, излучая позитроны. Эти радионуклиды называют эмиттерами позитрона. Позитроны уничтожаются при контакте с электронами. Этот процесс, обычно сопровождаемый эмиссией двух гамма-фотонов, каждый с энергией 511 кэВ, обычно с излучением под углом 180° друг к другу, называется аннигиляционным излучением.

Распад радионуклида происходит согласно законам вероятности с характерным постоянством и находится в экспоненциальной зависимости. Время, в течение которого число радиоактивных ядер уменьшается вдвое, называют периодом полураспада ($T_{1/2}$).

Проникающая способность каждого излучения существенно изменяется в зависимости от его природы и энергии. Альфа-частицы полностью поглощаются объектом, толщиной от нескольких микрометров до нескольких десятков микрометров. Бета-частицы полностью поглощаются объектом, толщиной от нескольких миллиметров до нескольких сантиметров. Гамма-излучение полностью не поглощается, а только уменьшается, и, например, для десятикратного уменьшения может потребоваться пластина свинца толщиной несколько сантиметров. В большинстве случаев с увеличением плотности объекта, уменьшается проникающая способность альфа- и бета-частиц и гамма-излучения.

Каждый радионуклид характеризуется постоянным периодом полураспада, выраженным в единицах времени, природой и энергией его излучения. Энергия выражается в электронвольтах (эВ), килоэлектронвольтах (кэВ) или мегаэлектронвольтах (МэВ).

Термин “радиоактивность” используется для описания феномена радиоактивного распада и для количественного физического выражения (активности) этого феномена. Радиоактивность вещества – это количество ядерных распадов или преобразований в единицу времени.

В Международной Системе единиц (СИ) радиоактивность выражается в беккерелях (Бк), один беккерель равен одному ядерному превращению в секунду. Точные (абсолютные) измерения радиоактивности могут быть сделаны только в специализированной лаборатории. Идентификация и относительное измерение уровня радиации могут быть выполнены в обычной лаборатории путем сравнения со стандартизированными веществами, проверенными компетентными органами.

Радионуклидная чистота: отношение радиоактивности определенного радионуклида к общей радиоактивности радиоактивного лекарственного средства, выраженное в процентах. Радионуклидные примеси, которые могут встречаться в лекарственном средстве с их предельными значениями, должны быть указаны в частной статье.

Радиохимическая чистота: отношение радиоактивности определенного радионуклида, который присутствует в радиоактивном лекарственном средстве в заявленной химической форме, к общей радиоактивности радионуклидов, присутствующих в радиоактивном лекарственном средстве, выраженное в процентах. Радиохимические примеси, которые могут встречаться в лекарственном средстве с их предельными значениями, должны быть указаны в частной статье.

Химическая чистота: химические примеси, которые могут встречаться в радиоактивном лекарственном средстве с их предельными значениями, должны быть указаны в частной статье.

Переносчик изотопа: стабильный изотоп соответствующего элемента, присутствующий или добавленный в радиоактивное лекарственное средство, в той же самой химической форме, что и сам радионуклид.

Удельная радиоактивность: радиоактивность радионуклида на единицу массы элемента или определенной химической формы.

Радиоактивная концентрация: радиоактивность радионуклида на единицу объема.

Общая радиоактивность: радиоактивность радионуклида на единицу измерения (флакон, капсула, ампула, генератор, и т.д.).

Стартовые материалы: все составляющие, которые используются при приготовлении радиоактивного лекарственного средства.

Гарантийный срок: время, в течение которого должны выдерживаться все показатели, указанные в частной статье. Срок годности и, при необходимости, время должны указываться в частной статье.

ПРОИЗВОДСТВО

Частная статья должна описывать метод производства радионуклида настолько точно, насколько это возможно. Радиоактивное лекарственное средство содержит радионуклид:

– как элемент в атомной или молекулярной форме, например [^{133}Xe], [^{15}O] O_2,

– как ион, например [^{131}I] йодид, [^{99m}Tc] пертехнетат,

– включенный в органические молекулы с образованием координационного комплекса, например [^{111}In] оксин или ковалентного соединения, например 2-[^{18}F]фтор-2-деокси-D-глюкоза.

Практические способы производства радионуклидов для использования в радиоактивных лекарственных средствах или как непосредственно радиоактивное лекарственное средство:

– бомбардировка материала-мишени нейтронами (в ядерных реакторах),

– бомбардировка материала-мишени заряженными частицами (в акселераторах типа циклотронов),

– ядерное деление тяжелых нуклидов материала-мишени (обычно после бомбардировки нейтронами или частицами),

– от изотопного генератора.

БОМБАРДИРОВКА НЕЙТРОНАМИ ИЛИ ЗАРЯЖЕННЫМИ ЧАСТИЦАМИ

Ядерная реакция и вероятность ее возникновения в единицу времени зависит от природы и физических свойств материала-мишени и природы, энергии и количества бомбардирующих частиц.

Ядерное преобразование, появляющееся в результате бомбардировки частицами может быть записано в следующей форме: ядро-мишень (бомбардирующая частица, излученная частица или излучение) произведенные ядра.

примеры: ^{58}Fe (n, γ) ^{59}Fe
^{18}O (p, n) ^{18}F

В дополнение к желаемой ядерной реакции могут произойти случайные преобразования, которые могут привести к появлению радиоактивных примесей. Они будут оказывать влияние на энергию образующихся частиц и чистоту материала-мишени. Такие побочные преобразования могут приводить к возрастанию уровня примесей в лекарственном средстве.

ДЕЛЕНИЕ ЯДРА

Небольшое количество нуклидов с высоким атомным номером являются делимыми. Например, наиболее часто используемой реакцией является реакция расщепления урана-235 нейтронами в ядерном реакторе.

Иод-131, молибден-99 и ксенон-133 могут быть произведены при ядерном расщеплении урана-235. Их выделение из смеси содержащей более 200 других радионуклидов должно тщательно контролироваться, чтобы минимизировать количество радиоактивных примесей.

ИЗОТОПНЫЕ ГЕНЕРАТОРЫ

Система изотопных генераторов использует относительно долгоживущий материнский радионуклид, который распадается до дочернего радионуклида, обычно обладающего более коротким периодом полураспада.

Несмотря на короткий период полураспада, допускается использование дочернего радионуклида в дальнейшем. Для этого его отделяют от материнского радионуклида, используя химический или физический процессы.

МАТЕРИАЛЫ-МИШЕНИ

Процентное соотношение основного радионуклида и радиоактивных примесей зависит от изотопного состава и чистоты бомбардируемого материала-мишени. Использование искусственно обогащенного изотопами материала-мишени, может улучшить конечный продукт на выходе.

Химическая форма, чистота, физическое состояние, химические добавки, условия бомбардировки, физическая и химическая среда, определяют химическое состояние и химическую чистоту произведенных радионуклидов.

При производстве радионуклидов и, в частности, короткоживущих радионуклидов перед обработкой и производством радиоактивного лекарственного средства невозможно определить какой-либо из качественных критериев. Поэтому каждая серия бомбардируемого материала-мишени должна проверяться в опытных производственных запусках перед его использованием в основном производственном процессе, чтобы обеспечить, при указанных условиях, выход радионуклидов в требуемом количестве с соответствующим качеством.

Бомбардируемый материал в газообразном, жидком или твердом виде должен находиться в емкости, обеспечивающей возможность облучения. Для бомбардировки нейтронами бомбардируемый материал обычно помещается в кварцевые ампулы или в алюминиевые или титановые контейнеры высокой степени очистки. Необходимо убедиться, что никакого взаимодействия между контейнером и его содержимым в условиях облучения (температура, давление, время) произойти не может.

Для бомбардировки заряженными частицами, емкость для бомбардируемых материалов обычно делают из алюминия или другого соответствующего металла, с входным отверстием и портами выхода, системой охлаждения и окном из тонкой металлической фольги. Природа и толщина окна оказывают влияние на продукт ядерной реакции и могут также повлиять на радиоактивную чистоту.

Описание производственного процесса включает:

– бомбардируемый материал-мишень,

– тип емкости для материала-мишени,

– способ загрузки материала-мишени в систему облучения,

– метод облучения (бомбардировки),

– выделение требуемого радионуклида,

и влияние всех условий производства на качественный и количественный выход готового радионуклида.

Химическое состояние изолированного радионуклида может играть основную роль в дальнейшей обработке.

ПРЕКУРСОРЫ ДЛЯ СИНТЕЗА

Обычно прекурсоры не производятся в больших масштабах. Прекурсоры синтезируются в лаборатории для производства радиоактивных лекарственных средств или поставляются специализированными производителями или лабораториями.

Испытания на идентичность, на химическую чистоту и количественное определение должны проводится в соответствии с валидированными процедурами.

Когда партии прекурсоров выбираются по данным сертификатов качества производителя, то должно проводиться, по крайней мере, одно испытание на идентичность.

Перед использованием в основном производственном процессе по изготовлению радиоактивных лекарственных средств, рекомендуется проверять материалы-прекурсоры в опытных производственных запусках, чтобы убедиться, что при указанных условиях производства, прекурсор дает на выходе радиоактивное лекарственное средство в требуемом количестве и соответствующего качества.

ПРОИЗВОДСТВЕННАЯ СИСТЕМА

Все операции, от подготовки бомбардировки до распределения готового радиоактивного лекарственного средства, включая их влияние на чистоту готового продукта и эффективность процесса, должны быть документированы. По возможности, необходимо выполнять контроль в ходе производственного процесса с регистрацией результатов на каждом этапе производства.

а) При производстве радиоактивного лекарственного средства могут использоваться механические и автоматизированные процессы, которые применимы в фармацевтической промышленности, и адаптированы к специфике радиоактивного производства.

б) Для изготовления радиоактивных лекарственных средств, содержащих короткоживущие радионуклиды, типа некоторых эмиттеров позитрона, обычно используются дистанционное управление производством и автоматизированный радиоактивный синтез. Для радионуклидов с очень коротким периодом полураспада (меньше 20 мин) контроль работы производственной системы является очень важной процедурой, так как это позволяет проверить качество радиоактивного лекарственного средства перед его выходом.

в) Любая производственная процедура должна быть валидирована в опытных производственных запусках перед ее использованием в основном производственном процессе, чтобы убедиться, что при указанных условиях производства, производственная система дает на выходе радиоактивное лекарственное средство в требуемом количестве с соответствующим качеством.

г) В практике медицинской радиологии приготовление дозированных форм готового радиоактивного лекарственного средства обычно включает ограничение радиоактивности начиная с готовых к использованию радиоактивных лекарственных средств, генераторов, комплектов и радиоактивных прекурсоров. Все условия, которые могут отразиться на качестве продукта (например, радиохимическая чистота и стерильность) должны быть четко установлены, а также включать соответствующие меры защиты от облучения.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ

Радиоактивный распад: радиоактивный распад находится в экспоненциальной зависимости от констант распада каждого отдельного радионуклида.

Кривая экспоненциального распада (кривая распада) выражается уравнением:

$$A_t = A_0 e^{-\lambda t}$$

A_t – радиоактивность во время t,

A_0 – радиоактивность во время t = 0,

λ – константа распада характерная для каждого радионуклида,

e – основание натурального логарифма.

Период полураспада ($T_{1/2}$) связан с константой распада (λ) уравнением:

$$T_{1/2} = \frac{\ln 2}{\lambda} \qquad (\ln 2 \approx 0{,}693)$$

Радионуклид идентифицируется по его периоду полураспада, природе и энергии его излучения, как указано в частной статье.

Измерение периода полураспада: Период полураспада измеряется с помощью подходящей аппаратуры обнаружения, такой как ионизационная камера, счетчик Гейгера-Мюллера, сцинтилляционный счетчик (твердый кристалл, жидкость) или полупроводниковый детектор. Исследуемый образец используется в том виде, в каком есть или растворяется, либо высушивается в капсуле после соответствующего растворения. Выбранная радиоактивность, используемая в экспериментальных условиях, должна быть достаточного уровня для обнаружения в течение нескольких периодов полураспада.

Исследуемое радиоактивное вещество подготавливается таким образом, чтобы избежать потери материала в период обработки. Жидкости (растворы), помещают во флаконы или запечатанные тубы, твердые вещества (остаток при высушивании в капсуле) помещают в упаковку из клейкой ацетилцеллюлозы или какого-либо другого материала.

Период полураспада исследуемого радиоактивного вещества измеряется при постоянных геометрических условиях и с промежутками, обычно соответствующими половине установленного периода полураспада, в течение времени приблизительно равного трем периодам полураспада. Правильное функционирование аппарата проверяется путем использования вещества с длинным периодом полураспада и, при необходимости, корректируется (см. Измерение радиоактивности).

Строится график зависимости времени (ось абсцисс) от логарифма относительного показания прибора (ось ординат). Рассчитанный период полураспада может отличаться не более, чем на 5 % от установленного в Фармакопее периода полураспада, если нет иных указаний в частной статье.

Определение природы и энергии излучаемой радиации:

Природа и энергия излучаемой радиации могут определяться путем построения кривой ослабления и использования метода спектрометрии. Кривая

ослабления используется для анализа электронного излучения; спектрометрия используется для идентификации гамма-лучей и детектируемого рентгеновского излучения.

Кривая ослабления строится:

– для чистых электронных эмиттеров, когда нет в распоряжении спектрометра для бета-лучей,

– для бета/гама эмиттеров, когда нет в распоряжении спектрометра для гамма-лучей.

Этот метод оценки максимальной энергии бета радиации дает только приблизительное значение. Исследуемое радиоактивное вещество, помещается в постоянные геометрические условия, впереди тонкого окна счетчика Гейгера-Мюллера или пропорционального счетчика. Исследуемое радиоактивное вещество подготавливается, как описано выше. Измеряют число разрядов исследуемого радиоактивного вещества. Между исследуемым веществом и счетчиком, сохраняя постоянные геометрические условия, последовательно помещают не менее шести алюминиевых экранов с увеличением массы каждого последующего на единицу площади таким образом, чтобы добавление каждого последующего экрана не сказывалось на числе разрядов чистого бета-излучения. Строят график зависимости массы экрана на единицу его площади выраженной в миллиграммах на квадратный сантиметр (ось абсцисс) от логарифма числа разрядов полученных для этого экрана (ось ординат). Таким же образом строят график зависимости для стандартизированного вещества. Массовые коэффициенты ослабления рассчитываются из срединных (прямолинейных) частей кривых.

Массовый коэффициент ослабления μ_m, выраженный в квадратных сантиметрах на миллиграмм, зависит от спектра энергии бета-излучения и от природы и физических свойств экрана. Это позволяет идентифицировать бета-эмиттеры. Массовый коэффициент ослабления рассчитывается по уравнению:

$$m_m = \frac{\ln A_1 - \ln A_2}{m_2 - m_1}$$

m_1 – масса на единицу площади самого легкого экрана,

m_2 – масса на единицу площади самого тяжелого экрана, m_1 и m_2 должны находиться в пределах прямолинейной части кривой,

A_1 – число разрядов для m_1,

A_2 – число разрядов для m_2.

Рассчитанный таким образом массовый коэффициент ослабления μ_m может отличаться не более, чем на 10 % от коэффициента, полученного при идентичных условиях, используя стандартизированную подготовку того же самого радионуклида.

Амплитуда бета-частиц – это дополнительный параметр, который может использоваться для определения бета-энергии. Ее определяют как массу на единицу площади, соответствующую пересечению экстраполяций спускающейся прямолинейной части кривой и горизонтальной линии фоновой радиоактивности из кривой ослабления, описанной выше.

Жидкостный сцинтилляционный счетчик может использоваться для получения спектров α и ß$^-$ эмиттеров (см. Измерение радиоактивности).

Гамма-спектрометрия используется для идентификации радионуклидов по энергии и интенсивности рентгеновского и гамма- излучений.

Наиболее подходящим детектором для рентгеновской и гамма-спектрометрии является германиевый полупроводниковый детектор. Также используется активизированный таллием йодисто-натриевый сцинтилляционный детектор, но он имеет более низкую энергетическую разрешающую способность.

Гамма-детектор должен быть откалиброван посредством использования стандартных радиоактивных веществ. Эффективность обнаружения измеряется путем использования калиброванного радиоактивного вещества или, для общих целей – по графику зависимости эффективности от энергии рентгеновского и гамма-излучения, который строится с помощью калиброванных радиоактивных веществ – источников различных радионуклидов.

Гамма- и рентгеновские спектры радионуклидов, являются специфическими для данного нуклида и характеризуются энергией и количеством фотонов, излучаемых при переходе из одного энергетического уровня на другой. Эта свойство используется для идентификации присутствующих радионуклидов в радиоактивном веществе и определения их количества, а также позволяет оценить количество других радионуклидных примесей.

Таблица физических характеристик радионуклидов (5.7) содержит наиболее общие физические характеристики радионуклидов, применяемых в медицинской практике и описанных в частных статьях. Кроме того, таблица содержит физические характеристики основных потенциальных примесей радионуклидов, описанных в частных статьях.

Под термином “вероятностью перехода” подразумевается вероятность преобразования ядра в данном состоянии энергии через определенный переход.

Под термином “вероятность эмиссии” подразумевают вероятность атома радионуклида, вызывать эмиссию частиц или определенного излучения.

Вероятность обычно измеряется за период 100 распадов.

ИЗМЕРЕНИЕ РАДИОАКТИВНОСТИ

Радиоактивность препарата устанавливается на определенный день и, если необходимо, на определенное время.

Абсолютное измерение радиоактивности конкретного образца может быть выполнено, если известна схема распада радионуклида, но на практике приходится вносить много исправлений, чтобы получить точные результаты. По этой причине обычно выполняют измерение при помощи первичного, стандартного радиоактивного вещества. Короткоживущие радионуклиды, например эмиттеры позитрона, не имеют первичных стандартов. Измерительные приборы калибруются с использованием стандартов определенных радионуклидов. Стандарты получают из аттестованных для этих целей лабораторий. Ионизационные камеры и счетчики Гейгера-Мюллера могут использоваться для измерения бета и бета/гамма эмиттеров; сцинтилляционые или полупроводниковые счетчики или ионизационные камеры могут использоваться для измерения гамма-эмиттеров; для измерения

низкоэнергетических бета-эмиттеров используется жидкостный сцинтилляционный счетчик. Для обнаружения и измерения альфа-эмиттеров необходимы специальные оборудование и методы. Для получения точных результатов необходимо выполнять испытания исследуемых радиоактивных веществ и стандартов в одинаковых условиях.

Низкоэнергетические бета-эмиттеры могут измеряться с помощью жидкостного сцинтилляционного счетчика. Для этого образец растворяют в растворе, содержащем один или более двух органических флуоресцентных вещества (первичные и вторичные сцинтилляторы), которые преобразовывают часть энергии распада в фотоны света, которые обнаруживаются фотомножителем и преобразовываются в электрические импульсы. При использовании жидкостного сцинтилляционного счетчика сравнительные измерения корректируются с поправкой на подавляющие свет эффекты. Прямые (непосредственные) измерения проводятся всегда в одинаковых условиях для исследуемого и стандартного радиоактивных веществ (например, объемы и тип растворов).

Все измерения радиоактивности должны корректироваться вычитанием фона, возникшего из-за радиоактивности окружающей среды, и из-за побочных сигналов, генерируемых самим оборудованием.

При работе с оборудованием, когда измерения производятся при высоких уровнях радиоактивности, иногда необходимо сделать поправку на конечное время отклика ("мертвое" время) детектора и связанного с ним другого электронного оборудования. Для системы подсчета с фиксированным "мертвым" временем τ расчет производят по формуле:

$$N = \frac{N_{наб}}{1 - N_{наб} t}$$

N – истинное число распадов в секунду,

$N_{наб}$ – наблюдаемое число распадов в секунду,

τ – "мертвое" время, в секундах.

Для некоторого оборудования это корректировка выполняется автоматически. Эти корректировки должны быть сделаны перед корректировкой фонового излучения.

После учета фона и электронных эффектов прибора (число распадов, поток ионизации, и т.д.), корректировка распада в течение времени t_m измерения определяется по формуле:

$$R_{корр} = \frac{R \dfrac{t_m \ln 2}{T_{1/2}}}{1 - \exp\left(-\dfrac{t_m \ln 2}{T_{1/2}}\right)}$$

$R_{корр}$ – показания прибора, откорректированные на начало отдельного измерения,

R – показания прибора до корректировки распада, но уже откорректированные с учетом фона, и т.д.

Результаты определений радиоактивности представляют собой колебания, которые являются результатом случайных процессов ядерного преобразования. Поэтому должно быть зарегистрировано достаточное количество распадов за единицу времени. Стандартное отклонение – это квадратный корень количества распадов, поэтому при минимуме в 10 000 распадов относительное стандартное отклонение составит не более 1 % (доверительный интервал 1 σ).

Результаты измерения радиоактивности сопровождаются указанием даты и, если необходимо, времени измерения. Эти данные должны быть сделаны со ссылкой на часовой пояс. Радиоактивность в другое время может быть рассчитана из экспоненциального уравнения или из таблиц.

Радиоактивность раствора выражается радиоактивной концентрацией. Радиоактивная концентрация – это радиоактивность единицы объема раствора.

РАДИОНУКЛИДНАЯ ЧИСТОТА

В большинстве случаев для определения радионуклидной чистоты радиоактивного фармацевтического препарата, идентичность каждого присутствующего радионуклида и их радиоактивности должны быть известны. Самым подходящим методом для проверки радионуклидной чистоты является гамма-спектрометрия. Однако этим методом не всегда легко обнаруживаются альфа- и бета-излучения, и, если используется йодисто-натриевый детектор, пики примесей с гамма-излучением часто затеняются спектром основного радионуклида.

Требования по радионуклидной чистоте (например, спектр гамма-излучения не должен значительно отличаться от спектра стандартизированного радиоактивного вещества) и нормы содержания определенных радионуклидных примесей (например, кобальт-60 в кобальте-57) указывают в частных статьях. Хотя эти требования необходимы, они не являются достаточными, чтобы определять радиоактивное лекарственное средство годным к медицинскому применению. Изготовитель должен проверить радионуклидные препараты с коротким периодом полураспада на содержание примесей с долгим периодом полураспада после соответствующего периода распада. Таким образом получают информацию относительно пригодности производственных процессов и адекватности процедур испытания. В случаях, когда два или более радионуклидов, излучающие позитроны необходимо идентифицировать и/или дифференцировать, как, например, 18F-примеси в 13N-препаратах, определение периода полураспада должно быть выполнено дополнительно методом гамма-спектрометрии.

Из-за различий в периодах полураспада различных радионуклидов, присутствующих в радиоактивном лекарственном средстве, радионуклидная чистота может изменяться со временем, но требования к радионуклидной чистоте должно выполняться в течение всего срока годности. В случае, когда период полураспада радионуклида в радиоактивном лекарственном средстве очень короток, такие испытания выполнить трудно. Поэтому перед разрешением выпуска серии радиоактивного лекарственного средства проводится контроль производственного процесса.

РАДИОХИМИЧЕСКАЯ ЧИСТОТА

Определение радиохимической чистоты радиоактивного лекарственного средства требует разделения входящих в его состав химических веществ, содержащих радионуклид и оценки их радиоактивности. Радиохимические примеси могут возникать при:

– производстве радионуклида,

– последующих химических процессах,

– неполном подготовительном разделении,

– химических изменениях в период хранения.

Требование радиохимической чистоты должны выполняться в течение всего срока годности.

Для определения радиохимической чистоты можно использовать любой метод аналитического разделения. Например, бумажная хроматография (2.2.26), тонкослойная хроматография (2.2.27), электрофорез (2.2.31), эксклюзионная хроматография (2.2.30), газовая хроматография (2.2.28) и жидкостная хроматография (2.2.29). При этом необходимо принять соответствующие меры для защиты от облучения.

УДЕЛЬНАЯ РАДИОАКТИВНОСТЬ

Удельная радиоактивность обычно вычисляется из радиоактивной концентрации (радиоактивность на единицу объема) и концентрации химического вещества, после определения радионуклидной и радиохимической чистоты радиоактивного лекарственного средства.

Удельная радиоактивность изменяется со временем, поэтому необходимо указывать дату (и время) определения. Требуемый уровень удельной радиоактивности должен выдерживаться в течение срока годности радиоактивного лекарственного средства.

ХИМИЧЕСКАЯ ЧИСТОТА

Для определения химической чистоты необходимо определить количество индивидуальных химических примесей, указанных в частной статье.

ЭНАНТИОМЕРНАЯ ЧИСТОТА

Необходимость проверки стереоизомерной чистоты, указывается в частной статье.

ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ

В частных статьях описываются испытания физиологического распределения радиоактивного лекарственного средства.

В общем, испытание выполняется следующим образом.

Исследуемое лекарственное средство вводится внутривенно каждому из трех животных. Разновидность, пол, порода и вес и/или возраст животных указываются в частной статье.

После соответствующей подготовки лекарственное средство вводится в хвостовую вену животного. В отдельных случаях используют введение в подкожные вены ног, бедренные, яремные или относящиеся к мужскому половому члену. Животные с признаками внесосудистой инъекции, исключаются из испытания.

После инъекции каждое животное немедленно помещается в отдельную клетку, условия содержания в которой, позволяют собирать выделения и предотвращать загрязнение поверхности тела животного.

По истечении определенного времени после инъекции, животные умерщвляются и расчленяются соответствующим способом. Из отобранных органов и тканей берутся пробы на их радиоактивность. Физиологическое распределение рассчитывается и выражается в процентном значении радиоактивности, обнаруженной в каждом из отобранных органов или тканей. Для этой цели радиоактивность в органе соотносится с введенной радиоактивностью, рассчитанной из радиоактивного содержания шприца, взвешенного до и после инъекции. Для некоторых радиоактивных лекарственных средств требуется определение соотношения радиоактивности к массе образцов отобранных тканей (радиоактивность/масса).

Радиоактивное лекарственное средство должно выдерживать требования физиологического распределения по крайней мере в двух из трех животных.

СТЕРИЛЬНОСТЬ

Радиоактивное лекарственное средство для парентерального применения должно производиться в асептических условиях. Испытание на стерильность выполняется, как описано в общей статье (2.6.1). Трудности возникают с радиоактивными лекарственными средствами с коротким периодом полураспада и из-за радиационной опасности. При невозможности проведения испытания стерильности готового радиоактивного лекарственного средства перед разрешением выпуска серии проводится контроль производственного процесса.

Если размер выпускаемой серии радиоактивного лекарственного средства ограничен одним или несколькими образцами (например, терапевтический или очень недолговечное радиоактивное лекарственное средство) исследование на стерильность не производится.

Если период полураспада радионуклида очень короткий (например, менее 20 мин), прием радиоактивного лекарственного средства пациентом обычно происходит в месте его производства, сразу после его изготовления.

Из соображений безопасности (высокий уровень радиоактивности) исследование стерильности (2.6.1) некоторых радиоактивных лекарственных средств не проводится.

Метод мембранной фильтрации является предпочтительным для уменьшения воздействия облучения на персонал.

Добавление антимикробных консервантов в радиоактивные лекарственные средства, фасованные в многодозовые контейнеры не является обязательным, если нет других указаний в частной статье.

БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ЭНДОТОКСИНЫ – ПИРОГЕНЫ

Для некоторых радиоактивных лекарственных средств проводится испытание на бактериальные эндотоксины. Испытание выполняется, как указано общей статье (2.6.14), принимая необходимые меры предосторожности по защите персонала от облучения.

Предельные показатели для бактериальных эндотоксинов указывают в частной статье.

Когда природа радиоактивного лекарственного средства не позволяет провести корректные испытания на пирогенность (2.6.8), такие испытания регламентируются специально.

Из-за невозможности проведения испытаний радиоактивных лекарственных средств с коротким периодом полураспада, перед разрешением выпуска серии проводится контроль производственного процесса.

ХРАНЕНИЕ

Хранят в герметично укупоренных контейнерах, в местах, обеспечивающих защиту персонала от облучения первичным или вторичным излучением, в соответствии с правилами по хранению радиоактивных веществ. В течение хранения, контейнеры из-за облучения могут темнеть, что не обязательно означает ухудшение качества лекарственного средства.

МАРКИРОВКА

На этикетке контейнера указывают:

– наименование лекарственного средства,

– наименование предприятия-изготовителя,

– идентификационный номер,

– для жидких и газообразных лекарственных средств: общая радиоактивность в контейнере, или радиоактивная концентрация на миллилитр с указанием даты и, если необходимо, времени; объем жидкости в контейнере,

– для твердых лекарственных средств: общая радиоактивность с указанием даты и, если необходимо, времени. После добавления соответствующего растворителя, твердое лекарственное средство считают жидким,

– для капсул: радиоактивность в капсуле с указанием даты и, если необходимо, времени; число капсул в контейнере.

В некоторых случаях на этикетки помещают дополнительную информацию, например, когда радиоактивные лекарственные средства содержат короткоживущие радионуклиды.

На вторичной упаковке указывают:

– всю информацию, указанную на контейнере,

– способ применения,

– срок годности,

– где применимо, наименование и концентрация антимикробного консерванта,

– где применимо, специальные

РАСТИТЕЛЬНЫЕ ЖИРНЫЕ МАСЛА

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Растительные жирные масла представляют собой смеси триглицеридов различных высокомолекулярных жирных кислот. Они могут содержать небольшие количества других липидов, таких, как воски, свободные жирные кислоты, частичные глицериды или неомыляемые вещества. Растительные жирные масла получают из семян и плодов различных растений посредством отжима и/или экстракции растворителями. Затем, по возможности, их очищают и гидрируют, при необходимости, добавляют антиоксидант.

Выжимное масло: масло, получаемое из сырья определенного качества посредством механической обработки (напр. холодного отжима или центрифугирования).

Очищенное масло: масло, получаемое посредством отжима и/или экстракции растворителями, и последующим щелочным рафинированием (сопровождается обесцвечиванием и дезодорацией) или физической очисткой.

Гидрогенизированное масло: масло, получаемое посредством отжима и/или экстракции растворителями, и последующим щелочным рафинированием или физической очисткой, гидрированием и последующим обесцвечиванием и дезодорацией.

Для приготовления парентеральных дозированных форм используются масла рафинированные только фосфорной кислотой и щелочью.

ПРОИЗВОДСТВО

ПОЛУЧЕНИЕ СЫРОГО МАСЛА

Из растений с высоким содержанием масла, в большинстве случаев, масло получают посредством горячего отжима с последующей экстракцией; из растений с низким содержанием масла – путем прямой экстракции.

Механические способы

А. Отжим

Отжим при высоком давлении. Состоит из всех или некоторых нижеследующих стадий: очистка, сушка, лущение или вышелушивание, размол, тепловая обработка и отслаивание.

На стадии *очистки* удаляют инородные примеси. *Сушка* может быть необходима, если содержание влаги в зернах превышает допустимое содержание влаги для процесса отжима под давлением. *Лущение* используют для получения продукта с большим содержанием белков и уменьшения примесей в масле. *Тепловая обработка* применяется для: разрушения клеток содержащих масло, снижения вязкости масла, коагуляции белков в продукте, регулирования влажности, стерилизации семян, устранение лишних компонентов семян (госсипол из семян хлопчатника) и фиксирования определенных фосфатидов в использованном сырье. Таким образом, уменьшаются потери при очистке. Эффективность процесса выделения такова, что только от 3 до 6 % масла остаются в использованном сырье.

Влажный отжим. Плоды загружаются в сетчатые барабаны и помещаются в горизонтальный стерилизатор для обработки паром и теплом с целью инактивации энзимов, разрыхления плодов, коагуляции белков и т. д. После прогревания в автоклаве масса загружается в пресс. Масло очищается в центрифуге и сушится в вакуумной сушилке.

Прессование с последующей экстракцией растворителем. Состоит из выше описанных стадий. Основное назначение процесса предварительного прессования – это получение массы с высокой водопроницаемостью для последующей стадии экстракции растворителями. Экстракция выполняется в перколяционных или иммерсионных аппаратах. Эффективность экстракции растворителями такова, что остаточный уровень масла в использованном сырье обычно меньше 1 %.

Б. Центрифугирование

С помощью центрифугирования отделяют маслянистую фракцию от воды и растворимых в воде компонентов и остаточных твёрдых частиц. Этот способ производства проводится с использованием:

– самоочистных роликовых или дисковых центрифуг,

– супер-декантаторов.

Экстракция растворителями. Перед экстракцией производятся следующие действия: семена выдерживаются около недели при температуре ниже 24°C, чтобы отделить шелуху от семени и позволить семенной влаге достичь баланса. Затем семена очищаются, шлифуются, лущатся и отделяются от чешуи. Наиболее часто используемый растворитель – смесь н-гексана и метилпентанов (точка кипения: 65-70°C), как правило относящихся к “гексанам”. Из-за высокой опасности воспламенения или взрыва этой смеси могут использоваться сжиженные или сверхкритические газы.

ОЧИСТКА

Очистка проводится с целью удаления из масла примесей, таким образом, чтобы как можно меньше разрушить триглицериды и обойтись минимальными потерями масла. В результате очистки удаляются следующие примеси:

– свободные жирные кислоты, которые могут вызвать ухудшение качества масла, проявляющегося в окислении, появлении вкуса дыма при нагревании и остром запахе (щелочное рафинирование),

– вода, способствующая ферментативному гидролизу (щелочное рафинирование, сушка),

– частичные глицериды, которые могут вызвать вспенивание и обуславливать горький вкус (нейтрализация, промывка),

– фосфатиды и фосфорные соединения, обладающие эмульгирующими свойствами, которые могут вызвать выпадение осадка, потемнение масла при нагревании, помутнение и ухудшение органолептических свойств (щелочное рафинирование),

– красящие вещества, такие как хлорофилл (щелочное рафинирование), каротиноиды (отбеливание),

– гликолипиды, которые могут образовывать коллоидные растворы с водой,

– свободные гидрокарбонаты, парафины, воски, и смолистые материалы,

– металлы (Fe, Cu, Pb, Sn, Pt, Pd и т д.), являющиеся сильными катализаторами окисления,

– пигменты, такие, как госсипол (в хлопковом масле) или микотоксины, такие как афлатоксин (в основном в арахисовом масле),

– пестициды,

– продукты окисления (альдегиды, пероксиды),

– протеины, которые могут вызвать аллергические реакции,

– неомыляемые вещества (например, лигнины, стеролы, токоферолы и другие витамины).

– полициклические ароматические углеводороды.

Щелочное рафинирование. Включает в себя следующие стадии: обессмоливание, щелочная нейтрализация, промывка и сушка.

Обессмоливание. На этой стадии проводится обработка водой и/или фосфорной кислотой, и/или натрия хлоридом, в результате чего удаляются фосфатиды, фосфорные соединения и металлы. Использование данного процесса зависит от природы масла.

Щелочная нейтрализация. На этой стадии уменьшается содержание жирных кислот до уровня менее 0,1 %; жирные кислоты преобразуются в нерастворимые в масле мыла. Другие вещества могут быть удалены посредством адсорбции на этих мылах: слизистые субстанции, фосфатиды, продукты окисления, красящие вещества, и т.д. Все субстанции, не растворимые в масле, при гидратации удаляются. Недостатком щелочной нейтрализации является возможность омыления части нейтрального масла.

Промывка. Эта стадия заключается в удалении избытков мыл и щелочей, а также следов металлов, фосфатидов и иных примесей при помощи горячей воды.

Сушка. Остатки воды устраняются под вакуумом перед последующими процедурами, такими как обесцвечивание.

Физическая очистка. Она включает паровую обработку масла при низком давлении и температуре выше 235°C. Эта способ подходит для масел с низким содержанием фосфатидов и металлов (пальмовое, кокосовое, оливковое масла) или для масел, из которых фосфатиды и металлы удаляются посредством кислотной обработки концентрированной фосфорной кислотой и последующей адсорбционной отбеливающей обработкой (подсолнечное, рапсовое и соевое масла). Этот способ не применяется для чувствительных к нагреву масел (хлопковое масло темнеет при обработке).

Обесцвечивание. Общим методом отбеливания является адсорбционная обработка масла, выдержанного при 90°C в течение 30 мин под вакуумом. Вещества, такие как хлорофилл и каротиноиды, оставшиеся после очистки, на данной стадии удаляются полностью.

Дезодорация. Дезодорация устраняет запахи, летучие субстанции и остатки от растворителей после экстракции; она заключается в введении сухого пара в масло, которое находится в вакууме при высокой температуре. В зависимости от вида масла применяются различные температурные режимы: от 200°C до 235°C в течение 1,5 ч – 3 ч или выше 240°C в течение 0,5 ч.

Одна из основных особенностей реакции – это термическое обесцвечивание путем разрушения каротиноидов при температуре выше 150°C. Этот метод приводит к потере субстанций, которые могут отгоняться (свободные жирные кислоты, стеролы, токоферолы и часть очищенного масла) и может привести к *цис-транс* изомеризации, ненасыщенных двойных связей жирных кислот.

ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ РАФИНИРОВАННОГО МАСЛА ОХЛАЖДЕНИЕМ

Это устранение твердых частиц и восков посредством фильтрации при низких температурах (также называется депарафинизация). Эти частицы и воски могут повлиять на внешний вид масла и выпадать в осадок.

ГИДРИРОВАНИЕ

Гидрирование высушенных и/или отбеленных масел проводиться с помощью катализаторов (например, Ni, Pt, Pd), при температурах от 100°C до 200°C под давлением водорода. Катализаторы впоследствии удаляются фильтрацией при температуре 90°C. Водород должен быть чистым: свободным от ядов для катализатора, воды, с низким содержанием двуокиси углерода, метана и азота. При этом может получаться небольшое количество *транс*-жирных кислот или полимеров.

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКАЯ ОЧИСТКА

При необходимости получения особо чистого масла, главным образом, для парентерального применения, оно очищается посредством пропускания через колонку, содержащую активированный сорбент. Для повышения эффективности иногда используются растворители. При этом удаляются преимущественно полярные молекулы, такие как оксиды, кислоты, спирты, частичные глицериды и свободные стеролы.

Если масло используется в приготовлении парентеральных дозированных форм, требования по предельным значениям кислотного и перекисного чисел и содержанию воды в частных статьях могут быть различными.

МАРКИРОВКА

На этикетке указывают:

– где это применимо, способ получения (отжим или экстракция),

– где это применимо, что масло подходит для производства парентеральных дозированных форм,

– название и концентрация любых добавленных антиоксидантов.

СУБСТАНЦИИ ДЛЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Требования данной статьи распространяются на субстанции, описанные в частных статьях Фармакопеи. Возможность применения этой статьи к другим субстанциям определяется компетентным уполномоченным органом.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Субстанции для фармацевтического использования (субстанции) - органические или неорганические вещества, которые используют как активные субстанции (действующие вещества) или вспомогательные вещества при производстве лекарственных средств, предназначенных для использования человеком. Они могут быть природного происхождения или полученные путем экстракции, ферментации или синтеза

Субстанции могут применяться непосредственно или как исходные материалы для производства лекарственных средств. В зависимости от состава лекарственного средства, некоторые субстанции могут использоваться как действующее или вспомогательное вещество. Твердые субстанции могут быть уплотненные, покрытые оболочкой, в виде гранул, измельченные до необходимого размера или обработанные другим способом. Обработка с добавлением вспомогательных веществ допускается только тогда, когда это указано в разделе «Определение» частной статьи.

Субстанции специальной квалификации. Если нет других указаний в частной статье, эти субстанции предназначены для использования людьми и в ветеринарии и имеют соответствующее качество при производстве всех лекарственных форм, для которых они могут быть использованы.

Полиморфизм. В частных статьях обычно не указывают кристаллическую или аморфную форму, если только это не влияет на биодоступность. Если нет других указаний в частной статье, все формы субстанций должны выдерживать требования монографий.

ПРОИЗВОДСТВО

Субстанции производят в условиях, которые обеспечивают качество и соответствие требованиям монографии или аналитической нормативной документации.

Независимо от того, указано или не указано в монографии, в приведенных ниже случаях субстанции дополнительно могут соответствовать следующим требованиям:
- субстанции - рекомбинантные белки или другие вещества, полученные при помощи генетической модификации, должны соответствовать требованиям статьи *«Продукты рекомбинантной ДНК-технологии»;*

- субстанции, полученные из животных, восприимчивых к инфекционному губчатому энцефалиту, за исключением экспериментально вызванных случаев, должны соответствовать требованиям статьи *«Продукты с риском контаминации возбудителями губчатого энцефалита»;*

- субстанции, полученные в результате процесса ферментации, независимо от того, модифицируются или не модифицируются использованные микроорганизмы обычным способом или рекомбинантною ДНК(r-DNA) - технологией, должны соответствовать требованиям статьи *«Продукты ферментации»*

Растворители, используемые в производстве субстанций должны быть соответствующего качества. Также следует принять во внимание их токсичность и остаточные количества (*5.4*). Вода, используемая в производстве субстанций, должна быть соответствующего качества.

Субстанции, изготовленные или обработанные с целью получения необходимой формы или качества, должны выдерживать требования монографий. Для контроля показателей, которые могут влиять на пригодность субстанции и таким образом, на

показатели приготовленных из них лекарственных форм, должны быть описаны необходимые функционально-связанные испытания.

Измельченные субстанции могут обрабатываться для получения необходимой степени измельчения *(2.9.12).*

Уплотненные субстанции получают для увеличения размера частиц или для получения частиц специфической формы и/или получения субстанций с наибольшей насыпной плотностью.

Покрытые оболочкой активные субстанции состоят из частиц действующего вещества, покрытого одним или несколькими вспомогательными веществами.

Гранулированные активные субстанции представляют собой частицы специфического размера и/или формы, изготовленные из действующего вещества путем прямой грануляции или грануляцией с использованием одного или нескольких вспомогательных веществ.

Если субстанции обрабатывают вспомогательными веществами, последние должны выдерживать требования монографии или, если монография отсутствует, соответствующей аналитической нормативной документации.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Положения, приведенные в данном разделе (например, растворимость или температура плавления), не являются обязательными. Они носят информационный характер.

Если субстанция обладает полиморфизмом, это должно быть указано в разделе «Определение» с целью применения обозначенной характеристики при производстве лекарственных средств.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ

В некоторых монографиях есть подразделы «Первая идентификация» и «Вторая идентификация». Обычно используют «Первую идентификацию». Если данная серия субстанции была раньше сертифицирована на соответствие всем требованиям монографии, испытания, указанные в другом подразделе, могут использоваться вместо испытаний из первого подраздела.

ИСПЫТАНИЯ

Полиморфизм. Если кристаллическая или аморфная форма субстанции накладывает ограничения на ее использование в лекарственных средствах, то определяют специфичность этой формы, определенным образом ее контролируют и обозначают эти характеристики на этикетке.

Сопутствующие примеси. Об наличие органических примесей в активных субстанциях информируют уполномоченный орган, и если возможно, их идентифицируют и квалифицируют (Таблица 2034.1).

Таблица 2034.-1

Предельные значения для информации, идентификации и определения органических примесей в активных субстанциях

Предназначение	Максимальная суточная доза	Предельные значения для информации	Порог чувстви-тельности для идентификации	Порог чувстви-тельности для определения
Для использования людьми или	≤ 2 г/день	> 0,05%	> 0,10 % или суточная доза > 1,0 мг	> 0,15% или суточная доза > 1,0 мг

людьми и в ветеринарии				
Для использования людьми или людьми и в ветеринарии	> 2 г/день	> 0,03%	> 0,05%	> 0,05%
Для использования только в ветеринарии	Не применяется	> 0,1%	> 0,2%	> 0,5%

Для примесей, которые характеризуются сильной токсичностью или непредвиденным фармакологическим действием, устанавливают индивидуальные предельные значения.

Эти требования не распространяются на биологические и биотехнологические продукты, пептиды, олигонуклеотиды, радиофармацевтические препараты, продукты ферментации и полученные из них полусинтетические продукты или на сырье животного или растительного происхождения.

Остаточные количества органических растворителей. Содержание регламентируют в соответствии с требованиями статьи *(5.4)*, используя общий метод статьи *(2.4.24)* или другие подходящие методы. Если проводят количественное определение остаточных количеств органических растворителей и не проводят испытание «Потеря в массе при высушивании», содержание остаточных количеств органических растворителей принимают во внимание при расчете количественного содержания субстанции.

Стерильность *(2.6.1)*. Если субстанция предназначена для производства стерильных лекарственных средств, которые не подвергаются дальнейшей стерилизации, или субстанция обозначена «стерильно», она должна выдерживать испытание на стерильность.

Бактериальные эндотоксины *(2.6.14)***.** Если субстанция обозначена, что она свободна от бактериальных эндотоксинов, она должна выдерживать требования на бактериальные эндотоксины. Предельная концентрация эндотоксинов и метод испытания (если это не метод гелеобразования А) указывают в частной статье. Предельную концентрацию рассчитывают в соответствии со статьей *«Испытание на бактериальные эндотоксины. Рекомендации» (2.6.14)*, если меньшая концентрация не установлена на основании результатов анализа промышленных серий или требований уполномоченного органа. Если проводят испытание на бактериальные эндотоксины, испытание на пирогены не требуется.

Пирогены *(2.6.8).* Если испытание на пирогены более необходимо, чем испытание на бактериальные эндотоксины, или если субстанция обозначена «апирогенна», она должна выдерживать испытание на пирогены. Критерии определения и метод испытания указывают в частной статье. На основании подходящей процедуры валидации испытания на бактериальные эндотоксины может заменить испытанием на пирогены.

Дополнительные определения. Контроль дополнительных определений (например, физические характеристики, функционально-связанные испытания) могут быть необходимы для конкретного производственного процесса или конкретного состава лекарственного средства. При производстве лекарственных средств для парентерального применения или других лекарственных форм могут использовать субстанции разных квалификаций (таких как «стерильно», «свободно от

бактериальных эндотоксинов», «апирогенно»), и соответствующие требования должны быть конкретизированы в частных статьях.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ

В субстанциях проводят количественное определение подходящим аналитическим методом, если нет других указаний в частной статье.

МАРКИРОВКА

Как правило, требования к маркировке устанавливаются национальным и наднациональным законодательством, а также в соответствии с международными требованиями. Таким образом, требования, приведенные в разделе «Маркировка» не являются полными. Они ориентированы в первую очередь на фармакопейные цели и обязательными являются только те положения, которые необходимы для подтверждения продукта требованиям статьи. Вся другая информация носит рекомендательный характер. В случае, когда в Фармакопеи используется термин «этикетка», соответствующая информация может быть обозначена на контейнере, на упаковке или в листке-вкладыше, утвержденном уполномоченным органом.

На этикетке указывают, что субстанция:

- предназначена для специфического использования;
- имеет кристаллическую форму;
- имеет степень измельчения;
- уплотненная;
- покрыта оболочкой;
- гранулированная;
- стерильна;
- свободна от бактериальных эндотоксинов;
- апирогенна;
- содержит скользящие вещества.

При необходимости, на этикете указывают степень гидратации, природу всех добавленных антимикробных консервантов, антиоксидантов или других вспомогательных веществ. Если активную субстанцию обрабатывают с добавлением вспомогательных веществ, на этикетке указывают используемые вспомогательные вещества, вместе с указанием активных и вспомогательных веществ.

ПОКАЗАТЕЛИ КАЧЕСТВА, ВКЛЮЧАЕМЫЕ В АНАЛИТИЧЕСКУЮ НОРМАТИВНУЮ ДОКУМЕНТАЦИЮ (АНД) НА СУБСТАНЦИИ

Требования данной статьи распространяются, прежде всего, на индивидуальные органические вещества. Для субстанций представляющих собой стандартизованную смесь биологически активных веществ растительного или животного происхождения, а также неорганических веществ возможны отклонения от данных требований или дополнительные требования, указанные в частных статьях.

Для индивидуальных органических субстанций приводят международное непатентованное название, химическое название по номенклатуре IUPAC, структурную формулу и брутто-формулу (для неорганических субстанций – молекулярную формулу), молекулярную массу (для кристаллосольватов – для сольватированной и несольватированной молекулы).

АНД на субстанции обычно содержит следующие разделы:

1. Описание.
2. Растворимость.

3. Идентификация.
4. Температура плавления*.
5. Температура кипения или температурный предел перегонки*.
6. Температура затвердевания*.
7. Относительная плотность (плотность)*.
8. Удельное оптическое вращение (оптическое вращение)*.
9. Удельный показатель поглощения*.
10. Показатель преломления*.
11. Вязкость*.
12. Показатели качества раствора:
    - прозрачность;
    - цветность;
    - кислотность (щелочность) или pH.
13. Механические включения*.
14. Сопутствующие примеси.
15. Остаточные количества органических растворителей.
16. Легкообугливающиеся вещества*.
17. Неорганические анионы (хлориды, сульфаты, нитриты и т.д.)*.
18. Неорганические катионы (железо и др.)*.
19. Тяжелые металлы.
20. Мышьяк*.
21. Потеря в массе при высушивании или вода.
22. Общая зола или сульфатная зола.
23. Микробиологическая чистота (или стерильность).
24. Пирогенны (или бактериальные эндотоксины)*.
25. Количественное определение.
26. Активность*.
27. Упаковка.
28. Маркировка.
29. Транспортирование.
30. Хранение.
31. Срок годности.

Разделы, обозначенные «*», включают в АНД в зависимости от природы и назначения субстанции.

Описание. Указывают характеристики физического состояния и цвет субстанции. Не следует включать описание вкуса. В необходимых случаях приводят информацию о запахе и гигроскопичности.

Допустимый диапазон цветности субстанции обычно должен быть в пределах оттенков, например: «Кристаллический порошок белого или белого с желтоватым оттенком цвета».

В некоторых случаях может быть указан численный диапазон размера частиц, а также введено исследование формы кристаллов. Такие испытания выносят в отдельные разделы.

Растворимость. Растворимость субстанции в различных растворителях рассматривают как дополнительную характеристику ее подлинности и чистоты, поэтому желательно использовать растворители, охватывающие широкую шкалу полярности, например, вода, спирт 96 %, ацетон, метиленхлорид, гексан. Не рекомендуется использование лекгокипящих и лекговоспламеняющихся (например, эфир диэтиловый) или сильно токсичных (например, бензол) растворителей.

Идентификация. Для идентификации субстанций обычно применяют сочетание инфракрасной спектроскопии, электронной спектрофотометрии или хроматографии

(газовой, жидкостной или тонкослойной) с характерными химическими реакциями. Возможно использование и других физико-химических методов.

Температура плавления *(2.2.14-2.2.16)*. Испытание обычно применяют для характеристики твердых веществ.

Температура кипения *(2.2.12)* или **Температурные пределы перегонки** *(2.2.11)*, **Относительная плотность (плотность)** (*2.2.5*), **Вязкость** (*2.2.8-2.2.10*), **Показатель преломления** (*2.2.6*), **Температура затвердевания** (*2.2.18*). Данные испытания вводят для характеристики жидких субстанций.

Удельное оптическое вращение (оптическое вращение) *(2.2.27)*. Вводят характеристики оптически активных веществ.

Удельный показатель поглощения (*2.2.24*). Вводят обычно в тех случаях, когда испытуемое вещество имеет максимумы поглощения в области от 220 нм до 800 нм. Данный показатель является дополнительной характеристикой идентификации и чистоты субстанции.

Прозрачность раствора (*2.2.1*), **Цветность раствора** (2.2.2). Данные испытания обязательно вводят для субстанций, используемых для приготовления парентеральных, глазных, назальных и ушных лекарственных средств. Для остальных лекарственных средств их желательно вводить для всех водорастворимых субстанций. Испытание обычно проводят в водных растворах субстанции, но возможно использование смешанных растворителей или самой субстанции.

Растворы субстанций, как правило, должны быть прозрачны.

Испытание «Цветность раствора» обычно не вводят в том случае, если субстанции окрашены. Данное испытание, если необходимо, можно заменить регламентацией оптической плотности при определенных длинах волн.

pH (Кислотность или щелочность). Для проведения данного испытания могут использоваться два подхода: измерение pH (*2.2.3*) или полуколичественное индикаторное титрование (кислотность и/или щелочность). Испытание обычно проводят в водных растворах субстанции, но возможно использование и смешанных растворителей. Допустимый интервал pH обычно должен быть не более 2.

Механические включения (*2.9.19-2.9.21)*. Данное испытание вводят для контроля качества стерильных субстанций, используемых для приготовления парентеральных и глазных лекарственных средств. Проверку осуществляют обычно в той максимальной концентрации, которую используют в соответствующих готовых лекарственных средствах.

Сопутствующие примеси. Данное испытание контролирует технологические примеси (полупродукты и побочные продукты), продукты разложения, а также в некоторых случаях посторонние примеси. В рамках этого испытания обычно не контролируют неорганические примеси и остаточные количества летучих органических растворителей. Испытание «Сопутствующие примеси» контролирует прежде всего примеси, которые определяются – примеси, фармакологические и токсикологические характеристики которых известны. Одновременно контролируют и другие примеси, которые определяются. Такие примеси не определяются с фармакологической и токсикологической точки зрения. Это прежде всего примеси, содержание которых менее 0,1 % (если нет указаний на их токсичность). Информацию о природе и количестве этих примесей необходимо представлять в уполномоченный орган.

Для контроля сопутствующих примесей могут применяться различные хроматографические и спектроскопические методы или их комбинации, однако большинство субстанций контролируют хроматографическими методами.

Суммарное содержание сопутствующих примесей обычно не должно превышать 2%.

В АНД должно быть указано, какие примеси контролирует раздел «Сопутствующие примеси», должны быть приведены их структурные и молекулярные формулы и массы. Следует отметить, что в субстанции могут обнаруживаться не только указанные примеси, а также возможные следовые количества других сопутствующих примесей, приведенные в приложении к АНД. Если субстанция содержит примесь в количестве выше 0,1%, которая не контролируется этим испытанием, это может означать, что эта субстанция получена по другой (не разрешенной уполномоченным органом) технологии и что используемая производителем технология не обеспечивает защиту от загрязнения посторонними примесями. Такая серия субстанции может использоваться только после специального разрешения уполномоченного органа.

Остаточные количества органических растворителей *(2.4.24, 5.4).* Содержание остаточных растворителей, использующихся при получении субстанции, должно соответствовать требованиям статьи *«Остаточные количества органических растворителей» (5.4)*.

В уполномоченный орган следует представить информацию об всех растворителях, используемых при производстве субстанции, и обоснование выбора растворителей, контролируемых в АНД. Наличие в субстанции других растворителей в концентрациях, превышающих 10 % от регламентируемых статьей (5.4), является признаком использования незарегистрированной технологии производства субстанции. Такая серия субстанции может использоваться только после специального разрешения уполномоченного органа.

Легкообугливающиеся вещества. Данное испытание является неспецифическим тестом на органические примеси и вводится в некоторых случаях для подтверждения чистоты субстанции. Испытание проводят с кислотой серной концентрированной с последующей оценкой окраски полученного раствора.

Неорганические анионы *(2.4).* В названии данного раздела должно быть конкретно указано, какой анион контролируют, например, «Хлориды». Выбор контролируемых анионов определяется технологическим процессом с обоснование в сопроводительной документации. При этом контролируемые анионы могут быть нетоксичными (например, хлориды, сульфаты и т.д.). Регламентация их содержания преследует цель дополнительно отличить зарегистрированную технологию от незарегистрированной. Пределы их содержания требуют необходимого обоснования.

Контроль анионов как примесей не вводят в том случае, если они входят в состав субстанции (например, вещество является гидрохлоридом или сульфатом).

Неорганические катионы (*2.4*). В названии данного раздела должно быть конкретно указано, какой катион контролируют. Этот раздел вводят в том случае, когда контроль содержания конкретных катионов является существенным для качества субстанций. Пределы их содержания требуют необходимого обоснования.

Контроль катионов как примесей не вводят в том случае, если они входят в состав субстанции (например, вещество является натриевой солью).

Тяжелые металлы (*2.4.8*). Содержание тяжелых металлов не должно превышать 0,001 %, если нет других указаний в частной статье.

Мышьяк (*2.4.2*). Данное испытание вводят в том случае, когда или исходное сырье может содержать мышьяк, например, для сырья природного происхождения, или возможно загрязнение им в процессе получения субстанции. Содержание мышьяка, как правило, не должно превышать 0,0001%.

Испытания **«Потеря в массе при высушивании»** (*2.2.32*) или **«Вода»** (*2.5.12*) вводят для контроля содержания летучих веществ и/или влаги в субстанции. Введение одного их этих испытаний, как правило, обязательно. Отсутствие их следует объяснять в пояснительной записке. Если нет других указаний в частной

статье и субстанция не является кристаллосольватом, потеря в массе при высушивании или содержание воды не должно превышать 0,5%.

Общая зола (*2.4.16*) или **Сульфатная зола** (*2.4.14*). Данные испытания характеризуют общую минерализацию субстанции. Как правило, сульфатная или общая зола не должны превышать 0,1%. Отсутствие данного испытания в АНД или повышенное содержание общей золы или сульфатной золы требует соответствующего обоснования.

Микробиологическая чистота (*5.1.4*). Данное испытание вводят для контроля качества нестерильных субстанций. Микробиологическая чистота субстанций должна обеспечивать необходимую микробиологическую чистоту соответствующих лекарственных средств.

Стерильность (*5.1.1*). Данное испытание вводят для контроля качества субстанций, используемых в производстве стерильных лекарственных средств, которые не подвергаются процедуре стерилизации.

Пирогены *(2.6.8)* или **Бактериальные эндотоксины** (*2.6.14*). Данные испытания проводят в следующих случаях:

- если субстанция используется в производстве готовых лекарственных средств, которые требуют отсутствия пирогенов или бактериальных эндотоксинов, но при этом не подвергаются соответствующей процедуре их удаления;

если в маркировке субстанции имеется указание об отсутствие пирогенов или бактериальных эндотоксинов.

Предельные значения и тест-методы устанавливают в частной статье.

Количественное определение. Для количественного определения действующего вещества в субстанции желательно использование прямых методов анализа. В случае солей обычно достаточно анализа только одного из ионов – предпочтительнее фармакологически активного. Обозначают пределы содержания действующего вещества в субстанции (обычно в пересчете на сухое или безводное вещество) или, если это невозможно определить, проводят определение таких параметров, которые связаны с содержанием действующего вещества в субстанции.

Если необходимо, определяют биологическую активность.

Если определение содержания действующего вещества в субстанции невозможно, проводят определение таких количественных показателей, которые связаны с содержанием действующего вещества в субстанции.

Упаковка и хранение. Упаковка и условия хранения должны обеспечивать качество субстанции в течение срока годности.

Маркировка. Маркировка должна содержать сведения о производителе, торговое и международное непатентованное название субстанции, условия хранения, меры предосторожности (если они необходимы), дату изготовления и срок годности.

Срок годности. Срок годности субстанций – промежуток времени, в течение которого производитель субстанции гарантирует ее соответствие требованиям АНД при соблюдении условий хранения. На всем протяжении этого срока годности субстанции можно использовать для приготовления готовых лекарственных средств, при условии соответствия их требованиям аналитической документации.

ТАБЛЕТКИ

Требования данной статьи не обязательны для таблетированных лекарственных средств, предназначенных к применению не оральным, а другим способом. Требования к таким лекарственным средствам могут быть приведены в других статьях, например, «Лекарственные средства для ректального применения», «Лекарственные средства для вагинального применения» и «Лекарственные средства для слизистой оболочки полости рта». Требования

данной статьи не распространяются на леденцы, оральные лиофилизаты, оральные пасты и жевательные резинки. Требования данной статьи не распространяются на таблетки для применения в ветеринарии, если нет других указаний в частных статьях.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Таблетки – твердые лекарственные средства, содержащие одну дозу одного или более действующих веществ и полученные обычно прессованием определенного объема частиц или агрегатов частиц, и предназначены для орального применения. Некоторые таблетки проглатывают целыми, некоторые – предварительно разжевывают, другие же растворяют или диспергируют в воде перед применением или оставляют во рту, где действующее вещество высвобождается.

Частицы состоят из одного или более действующих веществ и вспомогательных веществ, таких как разбавляющие, связывающие, разрыхляющие, скользящие вещества, способные изменить поведение лекарственной формы в пищеварительном тракте, красители, разрешенные к медицинскому применению, и ароматизаторы или без вспомогательных веществ.

Таблетки обычно представляют собой цельные правильные, круглые твердые цилиндры, верхняя и нижняя поверхности которых плоские или выпуклые, края поверхностей могут быть скошены. На поверхности таблеток могут быть нанесены штрихи, риски для деления, надписи и другие обозначения. Таблетки могут быть покрыты оболочкой.

Контейнеры для таблеток должны соответствовать требованиям статей *«Материалы, используемые для производства контейнеров» (3.1 и подразделы)* и *«Контейнеры» (3.2 и подразделы),* если нет других указаний в частной статье.

Таблетки для приема внутрь можно классифицировать как:

- таблетки без оболочки;
- таблетки, покрытые оболочкой;
- таблетки «шипучие»;
- таблетки растворимые;
- таблетки диспергируемые;
- таблетки диспергируемые в полости рта;
- таблетки с модифицированным высвобождением;
- таблетки кишечно-растворимые;
- таблетки для применения в полости рта.

ПРОИЗВОДСТВО

Таблетки обычно получают прессованием определенного объема частиц или агрегатов частиц, полученных методом грануляции. При производстве таблеток предпринимают соответствующие меры, обеспечивающие необходимую механическую прочность и устойчивость таблеток к раздавливанию и истиранию. Это подтверждается испытаниями *«Прочность таблеток без оболочки на истирание» (2.9.7)* и *«Прочность таблеток на сжатие» (2.9.8)*. Таблетки для разжевывания изготавливают, обеспечивая легкое разрушение при жевании.

Относительно делимых таблеток, уполномоченному органу представляют данные, подтверждающие, что разделенные вручную части таблетки выдерживают испытание (теста А) на однородность содержания действующего вещества в единице дозированного лекарственного средства *(2.9.6)* или на однородность массы для единицы дозированного лекарственного средства *(2.9.5),* соответственно.

В процессе производства, упаковки, хранения и реализации таблеток, предпринимают меры, обеспечивающие микробиологическую чистоту в

соответствии с требованиями статьи *«Микробиологическая чистота лекарственных средств» (5.1.4).*

ИСПЫТАНИЯ

Однородность содержания *(2.9.6).* Таблетки с содержанием действующего вещества менее 2 мг или менее 2% от общей массы содержимого должны выдерживать испытание на однородность содержания действующего вещества в единице дозированного лекарственного средства (тест А), если нет других указаний в частной статье. Если лекарственное средство содержит более одного действующего вещества, это требование распространяется только на те вещества, содержание которых соответствуют выше указанным условиям.

Таблетки, покрытые оболочкой, за исключением пленочного покрытия, должны выдерживать испытание на однородность содержания действующего вещества в единице дозированного лекарственного средства (тест А) независимо от содержания в них действующего вещества или веществ, если нет других указаний в частной статье,

Однородность массы *(2.9.5).* Таблетки без оболочки и, если нет других указаний в частной статье, таблетки, покрытые пленочной оболочкой, должны выдерживать испытание на однородность массы для единицы дозированного лекарственного средства. Испытание на однородность массы не требуется, если испытание на однородность содержания предусмотрено для всех действующих веществ или, если нет других указаний в частной статье.

Растворение. Испытание проводят для подтверждения высвобождения действующего вещества или веществ, например, одним из способов, описанных в статье *«Тест «Растворение» для твердых дозированных форм» (2.9.3).*

Если проводят испытание по показателю «Растворение», испытание по показателю «Распадаемость» не требуется.

Таблетки без оболочки

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Таблетки без оболочки – однослойные таблетки, полученные однократным прессованием частиц, или многослойные таблетки, состоящие из концентрических или параллельных слоев, полученные последовательным прессованием частиц различного состава. Используемые вспомогательные вещества специально не предназначены для высвобождения действующего вещества в желудочно-кишечном тракте.

Таблетки без оболочки соответствуют общему определению таблеток. На разломе при рассмотрении под лупою видна та или иная относительно однородная структура (однослойные таблетки) или послойная структура (многослойные таблетки), но не признаки оболочки.

ИСПЫТАНИЯ

Распадаемость. Таблетки без оболочки должны выдерживать испытание на распадаемость таблеток и капсул *(2.9.1)*. В качестве жидкой среды используют *воду Р*. В каждую стеклянную трубку помещают диск. Прибор включают на 15 мин, если нет других указаний в частной статье, и исследуют состояние таблеток. Если таблетки не выдержали испытание вследствие прилипания таблеток к дискам, испытание повторяют на следующих шести таблетках без дисков. Лекарственное испытание выдерживает испытание, если все шесть таблеток распались.

Таблетки для разжевывания испытанию на распадаемость не подлежат.

Таблетки, покрытые оболочкой

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Таблетки, покрытые оболочкой, - таблетки, покрытые одним или несколькими слоями смеси различных веществ таких, как натуральные или синтетические смолы, камеди, желатин, неактивные и нерастворимые наполнители, сахара, пластификаторы, полиспирты, воски, красители, разрешенные к медицинскому применению, и иногда ароматизаторы и действующие вещества. Вещества, используемые для покрытия таблеток, обычно наносят в виде растворов или суспензий в условиях, позволяющих растворителю испариться. Когда оболочка представляет собой очень тонкое полимерное покрытие, таблетки определяют как таблетки, покрытые пленочной оболочкой.

Таблетки, покрытые оболочкой, имеют гладкую поверхность, которая часто окрашена и может быть отполирована; на разломе при рассматривании под лупой видно ядро, окруженное одним или несколькими сплошными слоями различной структуры.

ПРОИЗВОДСТВО

Однородность содержания или однородность массы таблеток, покрытых оболочкой, за исключением таблеток, покрытых пленочной оболочкой, достигается путем контроля ядер таблеток.

ИСПЫТАНИЯ

Распадаемость. Таблетки, покрытые оболочкой, за исключением пленочной, должны выдерживать испытание на распадаемость таблеток и капсул *(2.9.1)*. В качестве жидкой среды используют *воду Р*. В каждую стеклянную трубку помещают диск. Прибор включают на 60 мин, если нет других указаний в частной статье, и исследуют состояние таблеток. Если не распалась хотя бы одна из шести таблеток, испытание повторяют на следующих таблетках, заменив *воду Р* в сосуде на *0,1 М кислоту хлористоводородную*. Лекарственное средство выдерживает испытание, если все шесть таблеток распались в кислой среде.

Таблетки, покрытые пленочной оболочкой, должны выдерживать испытание на распадаемость в условиях, принятых для таблеток без оболочки, при этом прибор включают на 30 мин, если нет других указаний в частной статье.

Если таблетки, покрытые оболочкой, или таблетки, покрытые пленочной оболочкой, не выдержали испытание вследствие прилипания таблеток к дискам, испытание повторяют на следующих шести таблетках без дисков. Лекарственное средство выдерживает испытание, если все шесть таблеток распались.

Таблетки для разжевывания, покрытые оболочкой, испытанию на распадаемость не подлежат.

Таблетки «шипучие»

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Таблетки «шипучие» - таблетки без оболочки, основную массу которых составляют кислоты и карбонаты или гидрокарбонаты, быстро реагирующие в присутствии воды с выделением углерода диоксида. Эти таблетки предназначены для растворения или диспергирования в воде перед применением.

ИСПЫТАНИЯ

Распадаемость. Одну таблетку помещают в лабораторный стакан, содержащий 200 мл *воды Р* при температуре от 15^0C до 25^0C; выделяются многочисленные

пузырьки газа. Таблетка считается распавшейся, если после прекращения выделения газа вокруг таблетки или ее фрагментов она или растворилась в воде без агломератов частиц. Повторяют процедуру на пяти других таблетках.

Лекарственное средство выдерживает испытание, если каждая из шести таблеток распалась в течение 5 мин, если нет других указаний в частной статье.

Таблетки растворимые

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Таблетки растворимые – таблетки без оболочки или таблетки, покрытые пленочной оболочкой. Эти таблетки перед применением растворяют в воде. В полученном растворе допускается легкая опалесценция из-за вспомогательных веществ, использованных при изготовлении таблеток.

ИСПЫТАНИЯ

Распадаемость. Таблетки растворимые должны распадаться в течение 3 мин, если испытание проводят по методике, описанной в статье *«Распадаемость таблеток и капсул» (2.9.1).* В качестве жидкой среды используют *воду Р* с температурой от 15^0С до 25^0С.

Таблетки диспергируемые

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Таблетки диспергируемые – таблетки без оболочки или таблетки, покрытые пленочной оболочкой. Перед применением их диспергируют в воде до образования гомогенной суспензии.

ИСПЫТАНИЯ

Распадаемость. Таблетки диспергируемые должны распадаться в течение 3 мин, если испытание проводят по методике, описанной в статье *«Распадаемость таблеток и капсул» (2.9.1).* В качестве жидкой среды используют *воду Р* с температурой от 15^0С до 25^0С.

Степень диспергирования. Две таблетки помещают в колбу, содержащую 100 мл *воды Р*, и перемешивают до полного диспергирования. Должна образовываться однородная суспензия, проходящая через сито с номинальным размером отверстий 710 мкм.

Таблетки, диспергируемые в полости рта

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Таблетки, диспергируемые в полости рта, – таблетки без оболочки, которые помещают в ротовую полость, где они быстро диспергируются прежде, чем будут проглочены.

ИСПЫТАНИЯ

Распадаемость. Таблетки, диспергируемые в полости рта, должны распадаться в течение 3 мин, если испытание проводят по методике, описанной в статье *«Распадаемость таблеток и капсул» (2.9.1).*

Таблетки с модифицированным высвобождением

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Таблетки с модифицированным высвобождением – таблетки, покрытые оболочкой, или без оболочки, содержащие специальные вспомогательные вещества или изготовленные специальными способами, которые отдельно или вместе предназначены для изменения скорости или места высвобождения действующего вещества или веществ.

К таблеткам с модифицированным высвобождением относятся таблетки с пролонгированным, замедленным и прерывистым действием.

ПРОИЗВОДСТВО

Проводят испытание, подтверждающее соответствующее высвобождение действующего вещества или веществ.

Таблетки кишечно-растворимые

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Таблетки кишечно-растворимые – таблетки с замедленным высвобождением, которые должны быть устойчивыми в желудочном соке и высвобождать действующее вещество или вещества в кишечном соке. Такие таблетки изготавливают, покрывая ядра таблеток оболочкой, устойчивой к желудочному соку (таблетки, покрытые кишечно-растворимой оболочкой) или изготавливают из гранул или частиц с нанесенной на них ранее оболочкой, устойчивой к желудочному соку.

Таблетки, покрытые кишечно-растворимой оболочкой, относят к группе таблеток, покрытых оболочкой.

ПРОИЗВОДСТВО

Для таблеток, приготовленных из гранул или частиц, предварительно покрытых кишечно-растворимой оболочкой, проводят необходимое испытание, подтверждающее соответствующее высвобождение действующего вещества или веществ.

ИСПЫТАНИЯ

Распадаемость. Для таблеток, покрытых кишечно-растворимой оболочкой, проводят испытание на распадаемость *(2.9.1)* со следующими изменениями: в качестве жидкой среды используют *0,1 М кислоту хлористоводородную*. Прибор включают на 2 ч, если нет других указаний в частной статье, без дисков и исследуют состояние таблеток. Время устойчивости таблеток в кислой среде может быть различным и зависит от состава испытуемых таблеток. Обычно оно составляет от 2 ч до 3 ч, но, даже если приведены другие указания в частной статье, время устойчивости в кислой среде должно быть не менее 1ч. Ни одна из таблеток не должна обнаруживать признаков распада (не считая фрагментов покрытия) и иметь трещин, через которые возможен выход содержимого. Кислоту заменяют *фосфатным буферным раствором рН 6,8 Р* и в каждую стеклянную трубку вносят диск. Прибор включают на 60 мин и исследуют состояние таблеток. Если таблетки не выдержали испытание вследствие прилипания к дискам, испытание повторяют на шести следующих таблетках без дисков. Лекарственное средство выдерживает испытание, если распались все шесть таблеток.

Растворение. Для таблеток, изготовленных из гранул или частиц, уже покрытых кишечно-растворимой оболочкой, проводят необходимое испытание, подтверждающее соответствующее высвобождение действующего вещества или веществ, например одним из способов, описанных в статье *«Тест «Растворение» для твердых дозированных форм» (2.9.3)*.

Таблетки для применения в полости рта

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Таблетки для применения в полости рта – обычно таблетки без оболочки. Состав обеспечивает медленное высвобождение и местное действие действующего вещества или веществ или высвобождение и всасывание действующего вещества или веществ в определенных областях рта. Таблетки для применения в полости рта должны выдерживать требования статьи *«Лекарственные средства для слизистой оболочки полости рта».*

\# Количество твина-80, кислоты стеариновой, кальция или магния стеарата в таблетках не должно превышать 1%, талька 3%, аэросила 10% от массы таблетки, если нет других указаний в частной статье.

\# Определение талька и аэросила**.** Около 1,0 г (точная навеска) порошка растертых таблеток, обрабатывают в сосуде 200 мл теплой *воды Р*. Полученную жидкость фильтруют через беззольный фильтр и сосуд тщательно ополаскивают водой Р. Остаток на фильтре несколько раз промывают теплой *водой Р* порциями по 10 мл до отсутствия видимого остатка после выпаривания капли промывной воды на часовом стекле. Фильтр с остатком высушивают, сжигают, прокаливают и взвешивают с точностью до 0,0001 г.

Если таблетка содержит несгораемые или нерастворимые в теплой *воде Р* вещества, навеску таблеток после сжигания и прокаливания обрабатывают при нагревании 30 мл *кислоты хлористоводородной разведенной Р.* Полученный раствор фильтруют и остаток на фильтре промывают горячей *водой Р* до отсутствия в промывной воде реакции на хлориды. Фильтр с остатком высушивают, сжигают, прокаливают и взвешивают с точностью до 0,0001 г.

Содержание талька и аэросила не должно превышать требований, указанных в частной статье.

ТАМПОНЫ МЕДИЦИНСКИЕ

К тампонам медицинским могут быть предъявлены дополнительные требования, указанные в других статьях, например *«Лекарственные средства для ректального применения»*, *«Лекарственные средства для вагинального применения»* и *«Ушные лекарственные средства».*

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Тампоны медицинские – твердые лекарственные средства, содержащие одну дозу лекарственного вещества и предназначенные для введения в полости на ограниченный период времени. Тампоны медицинские состоят из подходящего материала, такого как целлюлоза, коллаген или силикон, пропитанный одним или более действующим веществом.

ПРОИЗВОДСТВО

В процессе производства, упаковки, хранения и реализации тампонов медицинских, предпринимают меры, обеспечивающие микробиологическую чистоту в соответствии с требованиями статьи *«Микробиологическая чистота лекарственных средств» (5.1.4).*

МАРКИРОВКА

На этикетке указывают количество действующего вещества или веществ, содержащегося в тампоне.

ТРАНСДЕРМАЛЬНЫЕ ПЛАСТЫРИ

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Трансдермальные пластыри - эластичные фармацевтические лекарственные средства различных размеров, содержащие одно или более действующих веществ. Они предназначаются для аппликации на непоражённые кожные покровы с целью высвобождения действующего вещества или веществ в системное кровообращение через кожный барьер.

Трансдермальные пластыри обычно состоят из внешней оболочки, которая удерживает лекарственное средство с действующим веществом или веществами. Трансдермальные пластыри покрыты на участке высвобождения действующего вещества защитным слоем, который удаляют перед аппликацией пластыря на кожу. Внешней оболочкой является непроницаемая для действующего вещества или веществ и обычно для воды пластинка, предназначенная для удержания и защиты лекарственного средства. Внешняя оболочка может иметь те же размеры, что и само лекарственное средство, или по размерам она может быть больше. В последнем случае выступающий край внешней оболочки покрыт прикрепляющимся путём надавливания клейкими веществами, которые обеспечивают аппликацию пластыря на кожу. Лекарственное средство содержит действующее вещество или вещества и вспомогательные вещества, такие как, стабилизаторы, солюбилизаторы, или вещества, изменяющие скорость высвобождения действующего вещества или веществ или увеличивающие трансдермальное поглощение. Это может быть однослойная или многослойная твёрдая или пастообразная матрица, и в этом случае её состав и структура определяют диффузию действующего вещества или веществ на кожных покровах. Матрица может содержать прикрепляющиеся путём надавливания клейкие вещества, которые обеспечивают аппликацию лекарственного средства на коже. Лекарственное средство может существовать в виде полутвёрдой пластинки, одна сторона которой является оболочкой, контролирующей высвобождение и диффузию действующего вещества или веществ из лекарственного средства. В этом случае, прикрепляющиеся путём надавливания клейкие вещества могут располагаться на отдельных участках оболочки или на всей оболочке или только по краю внешней оболочки. При аппликации на сухую, чистую и неповреждённую кожу пластырь прочно прилипает к коже путём лёгкого надавливания рукой или пальцами и удаляется, не вызывая ощутимого повреждения кожи или вытеснения препарата из внешней оболочки. Пластырь не должен вызывать раздражения или повышенной чувствительности кожи даже после повторных аппликаций.

Защитный слой обычно изготавливают из пластика или фольги. При его удалении лекарственное средство или клейкое вещество не должны отделяться от пластыря. Трансдермальные пластыри обычно выпускают в отдельных пакетиках.

ПРОИЗВОДСТВО

При производстве, упаковке, хранении и реализации трансдермальных пластырей предпринимают меры, обеспечивающие микробиологическую чистоту в соответствии с требованиями статьи *«Микробиологическая чистота лекарственных средств» (5.1.4).*

ИСПЫТАНИЯ

Однородность содержания *(2.9.6)*. Трансдермальные пластыри должны выдерживать испытание на однородность содержания действующего вещества в единице дозированного лекарственного средства (тест С), если нет других указаний в частной статье.

Растворение. Проводят испытание для подтверждения соответствующего высвобождения действующего вещества или веществ, например, одним из способов, описанных в статье *«Тест «Растворение» для трансдермальных пластырей» (2.9.4).* В зависимости от состава, размеров и формы пластыря применяют или метод сборного диска, или метод ячеек, или метод вращающегося цилиндра.

Если используется мембрана, изготовленная из таких материалов как, инертная пористая целлюлоза или силиконы, то она не должна оказывать влияние на кинетику высвобождения действующего вещества или веществ из пластыря. Кроме того, мембрана не должна содержать веществ, которые могут оказывать влияние на её действие (например, жир). Мембрана может соответствующим образом обрабатываться перед проведением испытания, например, путём выдерживания её в среде для проведения испытания в течение 24 ч. Наложить мембрану на выступающий край пластыря, избегая образования пузырьков воздуха. Условия проведения испытания и требования к нему должны быть указаны в частной статье.

ХРАНЕНИЕ

Хранят при комнатной температуре, если нет других указаний в частной статье.

МАРКИРОВКА

На этикетке указывают:

- общее количество действующего вещества или веществ в одном пластыре;
- дозу, высвобождающуюся за единицу времени;
- площадь высвобождения действующего вещества или веществ.

УШНЫЕ ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Ушные лекарственные средства - жидкие, мягкие или твердые лекарственные средства, предназначенные для закапывания, распыления, вдувания или аппликации в слуховое отверстие или для промывания уха.

Ушные лекарственные средства обычно содержат одно или более действующих веществ в подходящем растворителе. Они могут содержать вспомогательные вещества, например, для обеспечения необходимого осмотического давления или вязкости, создания или стабилизации необходимого значения pH, увеличения растворимости действующих веществ, обеспечения стабильности или обеспечения соответствующих антимикробных свойств. Вспомогательные вещества в используемых концентрациях не должны отрицательно влиять на действие лекарственного средства, не должны оказывать токсичного или нежелательного местного раздражающего действия.

Лекарственные средства, применяемые при повреждениях уха, особенно при перфорации барабанной перепонки или перед хирургической операцией, должны быть стерильными, не должны содержать антимикробных консервантов и должны выпускаться в однодозовых контейнерах.

Ушные лекарственные средства, выпускаемые как в многодозовых, так в однодозовых контейнерах, снабжены при необходимости приспособлением, которое обеспечивает удобство применения и предотвращает загрязнение.

Если нет других указаний, водные ушные лекарственные средства выпускают в многодозовых контейнерах, содержат подходящий антимикробный консервант в необходимой концентрации, за исключением лекарственных средств, обладающих достаточным антимикробным действием.

Контейнеры для ушных лекарственных средств, должны соответствовать требованиям статей *«Материалы, используемые для производства контейнеров» (3.1 и подразделы)* и *«Контейнеры» (3.2 и подразделы),* если нет других указаний в частной статье.

Ушные лекарственные средства можно классифицировать как:

- ушные капли, спреи и аэрозоли;
- ушные мягкие лекарственные средства;
- ушные порошки;
- ушные промывки;
- ушные тампоны.

ПРОИЗВОДСТВО

При разработке ушных лекарственных средств, в состав которых входят антимикробные консерванты, уполномоченному органу представляют данные, подтверждающие эффективность выбранных консервантов. Метод определения и критерии оценки эффективности консервантов должны соответствовать требованиям статьи *«Эффективность антимикробных консервантов» (5.1.3).*

При производстве, упаковке, хранении и реализации ушных лекарственных средств предпринимают меры, обеспечивающие микробиологическую чистоту в соответствии с требованиями статьи *«Микробиологическая чистота лекарственных средств» (5.1.4).*

Стерильные ушные лекарственные средства производят с использованием материалов и методов, обеспечивающих стерильность, предотвращающих загрязнение лекарственных средств и развитие микроорганизмов, в соответствии с требованиями статьи *«Методы стерилизации лекарственных средств» (5.1.1).*

При производстве ушных лекарственных средств, содержащих диспергированные частицы, предпринимают меры, обеспечивающие необходимый размер частиц и их контроль.

ИСПЫТАНИЯ

Однородность содержания *(2.9.6).* Ушные лекарственные средства в однодозовых контейнерах с содержанием действующего вещества менее 2 мг или менее 2% от общей массы содержимого должны выдерживать испытание на однородность содержания действующего вещества в единице дозированного лекарственного средства (тест B), если нет других указаний в частной статье. Если лекарственное средство содержит более одного действующего вещества, это требование распространяется только на те вещества, содержание которых соответствуют выше указанным условиям.

Однородность массы *(2.9.5).* Ушные лекарственные средства в однодозовых контейнерах должны выдерживать испытание на однородность массы для единицы дозированного лекарственного средства. Испытание на однородность массы не требуется, если испытание на однородность содержания предусмотрено для всех действующих веществ.

Стерильность *(2.6.1).* Если на этикетке указано, что лекарственное средство стерильно, оно должно выдерживать испытание на стерильность.

ХРАНЕНИЕ

Если лекарственное средство стерильно, хранят в стерильных, герметичных контейнерах с контролем первого вскрытия, если нет других указаний в частной статье.

МАРКИРОВКА

На этикетке указывают:

- название всех добавленных антимикробных консервантов;
- «стерильно», если необходимо;
- для лекарственных средств в многодозовых контейнерах: срок хранения после вскрытия. Этот срок не должен превышать 4 недели, если нет других указаний в частной статье.

Ушные капли и спреи

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Ушные капли и спреи - растворы, эмульсии или суспензии, содержащие одно или более действующих веществ в подходящих жидкостях (например, вода, гликоли или жирные масла), и предназначенные для введения в слуховое отверстие без оказания опасного давления на барабанную перепонку. Они также могут быть введены в слуховое отверстие посредством тампона, пропитанного лекарственным средством.

Ушные эмульсии могут расслаиваться, но при взбалтывании легко восстанавливаются.

Ушные суспензии могут образовывать осадок, который должен быстро ресуспендироваться при взбалтывании, образуя суспензию, достаточно стабильную, чтобы обеспечить необходимую дозу введения.

Ушные капли обычно выпускают в многодозовых контейнерах из стекла или подходящего пластикового материала, снабженных встроенной капельницей или закручивающейся крышкой из подходящего материала с капельницей и резиновым или пластмассовым соском. Комплект такой крышки может прилагаться отдельно. Спреи обычно выпускаются в многодозовых контейнерах, снабженных подходящим аппликатором. Если спреи выпускаются в контейнерах под давлением, то они должны выдерживать требования статьи *«Лекарственные средства, находящиеся под давлением».*

Ушные мягкие лекарственные средства

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Ушные мягкие лекарственные средства предназначены для введения в наружное слуховое отверстие. Если необходимо, закладывают или вводят тампон, пропитанный лекарственным средством.

Ушные мягкие лекарственные средства должны соответствовать требованиям статьи *«Мягкие лекарственные средства для местного применения».*

Их выпускают в контейнерах, снабженных подходящим аппликатором.

Ушные порошки

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Ушные порошки должны соответствовать требованиям статьи *«Порошки для наружного применения».*

Их выпускают в контейнерах, снабженных подходящим устройством для аппликации или вдувания.

Ушные промывки

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Ушные промывки - лекарственные средства, предназначенные для очистки слухового отверстия. Они обычно представляют собой водные растворы со значением pH, соответствующим физиологическим пределам.

Ушные промывки, применяемые при повреждениях уха или перед хирургическими операциями, должны быть стерильными.

ИСПЫТАНИЯ

Масса или объем содержимого контейнера *(2.9.28).* Ушные промывки в однодозовых контейнерах должны выдерживать испытание на массу или объем содержимого контейнера.

Ушные тампоны

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Ушные тампоны предназначены для введения в наружное слуховое отверстие. Они должны соответствовать требованиям статьи *«Тампоны медицинские».*